



Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Centro de Investigación en Biotecnología

Maestría en Biotecnología

Evaluación de la preferencia de la HSL BaEstB sobre el 2-naftil acetato vs p-nitrofenil acetato mediante parámetros cinéticos

MARÍA GUADALUPE MORALES MORALES

DIRECTOR

DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca 62209, Morelos, México.

Junio del 2022

RESUMEN

La prospección y caracterización de enzimas generan información relevante para obtener alternativas que otorguen mayor eficiencia catalítica para la producción de compuestos orgánicos interesantes. Las enzimas lipolíticas bacterianas (lipasas y esterases) presentan actividades de síntesis y/o hidrólisis de una amplia variedad de sustratos esterificados. En el laboratorio de Biología Molecular de Hongos se realizó la caracterización bioquímica de una esterasa HSL que fue aislada a partir de una librería de cDNA del hongo Basidiomiceto *Bjerkandera adusta* crecido en petróleo crudo, la cual fue denominada *BaEstB*. Se demostró que tiene una preferencia por cadenas acilo 2C, sin embargo, su actividad se reduce hasta 18 veces frente al *p*-NPA, e incluso muestra regioselectividad inclinada por el 2-NA que para 1-NA. Entonces se propuso que la especificidad pudiera verse influenciada por la parte alcohol del sustrato. Posteriormente, se demostró a través de estudios in silico y de HPLC que esta enzima es capaz de hidrolizar el ergosteroil-acetato. Además, a partir de un análisis de “docking” se determinó que las líneas mutantes (Y81S y L211W) son capaces de utilizar sustratos de cadena acilo mayor a 2C, como ha sido demostrado por la enzima ortóloga *RmEstB* del hongo mucoral *Rhizomucor miehei*. En este proyecto se logró la inducción de la *BaEstB* wt y de las líneas mutantes a las 72 h. Dada la notable preferencia de la *BaEstB* wt por el 2-NA, se utilizó para determinar el valor de K_m que fue de 20 μM y una velocidad de 1×10^{-6} $\mu\text{mol}/\text{min}$. Es importante comparar la actividad de la *BaEstB* wt y sus líneas mutantes a determinada concentración del ergosteroil acetato, 1-NA, 2-NA y *p*-NPA y poder dilucidar la preferencia entre estos sustratos, e incluso establecer una correlación con los residuos de aminoácidos que se encuentran en el túnel de entrada al sitio activo. Esto permitiría una caracterización completa, evaluando tanto sustratos comerciales como naturales, y podría darnos indicios de si el ergosterol acetilado es su sustrato celular. Este estudio pone en perspectiva la necesidad de evaluar la especificidad de este tipo de enzimas en sustratos no convencionales como los esteroides esterificados y los alcoholes terciarios. Por lo que hipotetizamos que la HSL *BaEstB* será una enzima que podría ser utilizada para la obtención de compuestos orgánicos interesantes.

ABSTRACT

Enzyme prospecting and characterization can generate relevant information that could obtain alternatives that provide greater catalytic efficiency for the production of interesting organic compounds. Bacterial lipolytic enzymes (lipases and esterases) they present activities of synthesis and/or hydrolysis of a wide variety of esterified substrates. The biochemical characterization of an HSL esterase was made in the Laboratory of Molecular Biology of Fungi; was isolated from a cDNA library of the fungus Basidiomycete *Bjerkandera adusta* grown in crude oil, which was named *BaEstB*. It was shown to prefer 2C acyl chains; however, its activity is reduced to 18-fold against *p*-NPA, and it even shows inclined regioselectivity for 2-NA than for 1-NA. It was proposed the alcohol part of the substrate could be influenced by the specificity. Subsequently, through *in silico* and HPLC studies this enzyme was shown the capacity of hydrolyzing ergosteroyl-acetate. In addition, from a docking analysis it was determined that the mutant lines (Y81S and L211W) are capable of using substrates with an acyl chain reater than 2C, as has been demonstrated by the orthologous enzyme *RmEstB* of the mucoral fungus *Rhizomucor miehei*. In this project, the induction was achieved of *BaEstB* wt and of the mutant lines at 72 h. Given the notable preference of wt *BaEstB* for 2-NA, it was used to determine the value of K_m which was 20 μM and a rate of 1×10^{-6} $\mu\text{mol}/\text{min}$. It is important to determine the activity of *BaEstB* wt and its mutant lines at a certain concentration of ergosteroyl acetate, 1-NA, 2-NA and *p*-NPA, in order to compare them and be able to elucidate the preference between these substrates, and even establish a correlation with the amino acid residues found in the entry tunnel to the active site. Thus, its characterization would be more complete, since commercial and natural substrates are evaluated, resolving whether ergosterol fulfills a physiological role. This characterization could be a guideline to explore the specificity in unconventional substrates such as esterified sterols and tertiary alcohols. Proposing *BaEstB* as a candidate or one of its mutant lines as alternatives for obtaining interesting organic compounds.

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos por no abandonar esta meta personal y profesional. Agradecida en general por todo el aprendizaje, no dudaré de ponerlo en práctica.

Especialmente

A mi directora de tesis, la Dra. Rayo, muchas gracias por toda la paciencia, comprensión y apoyo, gracias a su guía no dejé este proyecto cuando más desmotivada estaba.

Gracias a los doctores miembros de mi comité tutorial por las recomendaciones y consejos, al Dr. Alexandre Taketa por el apoyo en los experimentos y materiales.

A los doctores IBt- UNAM, Claudia Martínez por el apoyo en los experimentos; Edmundo Castillo por todas las reuniones de asesoría, muchas gracias por su tiempo.

A mis compañeros de generación por la compañía y el apoyo. A mis compañeros del laboratorio: Eya, Karla, Martín, Ricardo, Luis Fernando, Jasiel, Amairani y los nuevos. Muchas gracias por sus consejos, ayuda en los experimentos, pláticas y en sí por hacer mis días divertidos con su compañía, ah y gracias por el café.

Gracias al Dr. Jordi Folch por el apoyo y abrirme las puertas de su laboratorio.

Gracias a mis amigos de Cuernavaca: Marco, Sam, Adriana y Damián que también fue hermoso conocerlos, conservaré su amistad con mucho cariño.

Gracias Moni y Susy, gracias por su apoyo incondicional sin ustedes este proyecto no hubiera terminado.

Gracias totales a todas las personas que fueron de mucha ayuda en todo mi proceso, siempre les estaré agradecida. Toda mi estima y cariño para ustedes.

Además, me gustaría agradecer a la científica y programadora Alexandra Elbakián fundadora del proyecto web sci-hub, que brinda acceso gratuito a artículos científicos. Gracias al libre acceso al conocimiento científico estudiantes como yo no habrían enriquecido sus proyectos de investigación.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi Yo del futuro. Que en algún día que tenga que volver a leerla, recuerde que es muy capaz de hacer lo que se proponga; ¡cree más en ti!

Dedicada también a mi familia, éste logro también es suyo.

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Aplicaciones industriales	2
1.2 Características bioquímicas y estructurales de las enzimas lipolíticas	6
1.3 Clasificación	7
1.4 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión heteróloga	10
2. ANTECEDENTES	14
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPOTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo general:	19
5.1.1 Objetivos específicos:	20
6. METODOLOGÍA	20
6.1 Generación de Mutantes	20
6.2 Clonación, secuenciación y transformación	21
6.3 Selección de las líneas mutantes HSL <i>BaEstB</i> Y81S y L211W	22
6.4 Inducción y expresión de <i>BaEstB</i> silvestre	23
6.4.1 Inducción <i>BaEstB</i> mutantes	23
6.4.2 Análisis de inducción y detección de actividad	24
6.5 PURIFICACIÓN Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD ESTERASA	24
6.5.1 Cuantificación de proteína por método de Bradford	25
6.5.2 Ensayos de actividad hidrolítica	25
7. RESULTADOS	27
7.1 Obtención de plásmidos pPICZαA:: <i>BaEstB</i> _Y81S y pPICZαA:: <i>BaEstB</i> _L211W	27

7.1.1 Purificación del plásmido pPICZαA::BaEstB	27
7.1.2 Diseño de los oligonucleótidos para generar a las mutantes Y81S y L211W	28
7.1.3 Mutagénesis sitio dirigida por PCR- All around	30
7.2 Clonación y secuenciación de los plásmidos pPICZαA::BaEstB_Y81S y pPICZαA::BaEstB_L211W	31
7.2.1 Transformación en <i>E. coli</i> 1116	31
7.2.2 Secuenciación de los plásmidos pPICZαA::BaEstB con las mutaciones en Y81S y L211W	32
	33
7.3 Transformación de pPICZαA::BaEstB_Y81S y pPICZαA::BaEstB_L211W en <i>Pichia pastoris</i> X-33	33
7.4 Selección de mutantes positivas	36
7.4.1 Determinación del fenotipo Mut	36
7.4.2 Confirmación por PCR de mutantes	37
7.4.3 Secuenciación de productos PCR	40
7.5 Inducción, expresión y purificación BaEstB silvestre	42
7.5.1 Análisis de inducción BaEstB mutantes por colony blot	44
7.6 Ensayos de actividad esterasa y determinación de los parámetros cinéticos de BaEstB wt	45
8. DISCUSIÓN	50
9. CONCLUSIONES	52
10. PERSPECTIVAS	53
11. ANEXOS	54
12. BIBLIOGRAFÍA	57

1. MARCO TEÓRICO

Introducción

La producción de enzimas de interés industrial es relevante ya que estas generan compuestos puros enantioméricos, tienen alta quimioselectividad, regioselectividad y estereoselectividad y su uso generalmente reduce el número de pasos para obtener un producto de interés disminuyendo la cantidad de desechos generados, y en consecuencia disminuyendo el gasto energético y económico (Choi *et al.*, 2015; Arroyo *et al.*, 2014).

Alrededor de un 90% de las enzimas industriales son formas recombinantes producidas en bacterias y hongos. Sin embargo, estas enzimas son inicialmente identificadas y aisladas de diversos organismos. Particularmente muchos microorganismos son una fuente importante de enzimas, ya que la gran diversidad microbiana junto con las herramientas que ofrece la biotecnología en campos como la microbiología industrial, biología molecular e ingeniería de proteínas, permite la expresión de enzimas que pueden comercializarse para diversas aplicaciones. Tan solo en el año 2018 las enzimas desarrolladas y producidas para aplicaciones industriales representaron para el mercado un valor global estimado de 9.3 mil millones de USD (Adrio & Demain, 2014; Demain & Adrio, 2008; Grand View Research, 2019).

El mercado industrial demanda la prospección de enzimas con propiedades catalíticas mejoradas y novedosas. Diversas metodologías como el cribado metagenómico, extracción y secuenciación de genomas microbianos, y el aprovechamiento de microorganismos extremófilos, entre otras, nos ayudan a encontrar enzimas con características deseadas. El análisis de genomas de organismos difíciles de cultivar ha permitido la identificación de secuencias que codifican para numerosas enzimas y su producción posterior en sistemas heterólogos (Luo *et al.*, 2012; Adrio & Demain, 2014). Tal es el caso de una HSL (del inglés: hormone-sensitive lipase) esterasa aislada a partir de una librería de cDNA de un hongo Basidiomiceto crecido en petróleo crudo y que ha sido

caracterizada en el laboratorio de Biología Molecular de hongos en el CeIB (Sánchez-Carbente *et al.*, 2017), entre otras.

Dado que algunas enzimas con especificidad y enantioselectividad, no siempre resultan estables o eficientes bajo condiciones industriales, se han utilizado diversas estrategias para mejorar y/o modificar las propiedades de una enzima ya existente, dichas estrategias están basadas en los aportes de la ingeniería de proteínas. Las técnicas de ADN recombinante, así como las estrategias basadas en la evolución racional, semirracional y dirigida al azar utilizadas en la rama de ingeniería de proteínas, permiten obtener enzimas con propiedades novedosas, logrando aumentar la producción de enzimas hasta 100 veces. Por ejemplo, la evolución enzimática dirigida mediante la generación secuencial de mutagénesis aleatoria de una *p*-nitrobenzil esterasa de *Bacillus subtilis*, en donde el resultado neto de cuatro generaciones secuenciales de mutagénesis aleatoria y un único paso de recombinación aumento de 50 a 60 veces su actividad. (Chirumamilla *et al.*, 2001; Singhania *et al.*, 2010; Adrio & Demain, 2014).

1.1 Aplicaciones industriales

Las hidrolasas son enzimas utilizadas en industria: farmacéutica, de biocombustibles, de detergentes y de alimentos. Las proteasas, lipasas y amilasas, son utilizadas para el desarrollo de detergentes que evitan el desgaste de las telas; a las celulasas y xylanasas utilizadas en la industria del papel, textil o en biocombustibles (Hess, 2008). Todas las antes mencionadas también son utilizadas por la industria de alimentos y bebidas. En el caso de la industria farmacéutica se han utilizado proteasas y lipasas, estas últimas utilizadas debido a su alto nivel de especificidad, siendo una tecnología alternativa a la cromatografía quirál (Guerrand, 2017; Gerard, 2015).

Tan solo en el 2016, el valor del mercado mundial de enzimas industriales se estimó de entre \$5000 a \$5500 millones de dólares. En el que predomina el segmento de las amilasas (carbohidrasas), seguido de las proteasas, las lipasas, entre otras (Figura 1). Tanto lipasas como esterasas exhiben estabilidad inclusive en sistemas no convencionales (solventes orgánicos) preservando la especificidad por el

sustrato (aunque es más pronunciada en las lipasas) y algunas no requieren cofactores, por lo que representan excelentes candidatos para la producción de compuestos ópticamente puros en síntesis de productos químicos finos (Ramnath *et al.*, 2016; Haki & Rakshit 2003; Bornscheuer, 2002; López & Gotor, 2015).

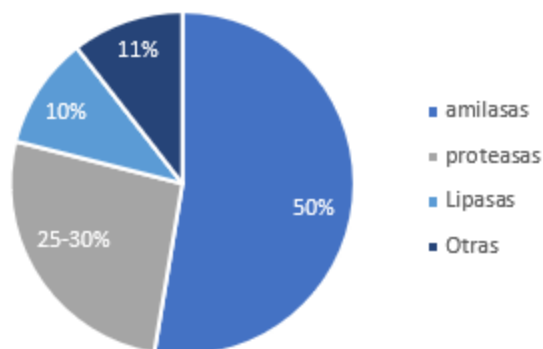


Figura 1. Segmentos del mercado global de enzimas (Guerrand, 2017)

Esterasas

Las esterasas (EC 3.1.1.x) son un grupo diverso de hidrolasas con el plegamiento característico α/β -hidrolasa, que consiste en 8 hojas β centrales rodeadas por un número variable de hélices α , que catalizan la ruptura y formación de los enlaces éster (Ollis *et al.*, 1992; Bornscheuer, 2002) (ver Figura 2). Estas se clasifican en lipasas (E.C.3.1.1.3 triacilglicerol hidrolasas) y esterasas verdaderas (E.C.3.1.1.1 carboxil-éster hidrolasas) (Bornscheuer, 2002). Las primeras actúan sobre triglicéridos insolubles en agua que contienen ácidos grasos de cadena larga (>10

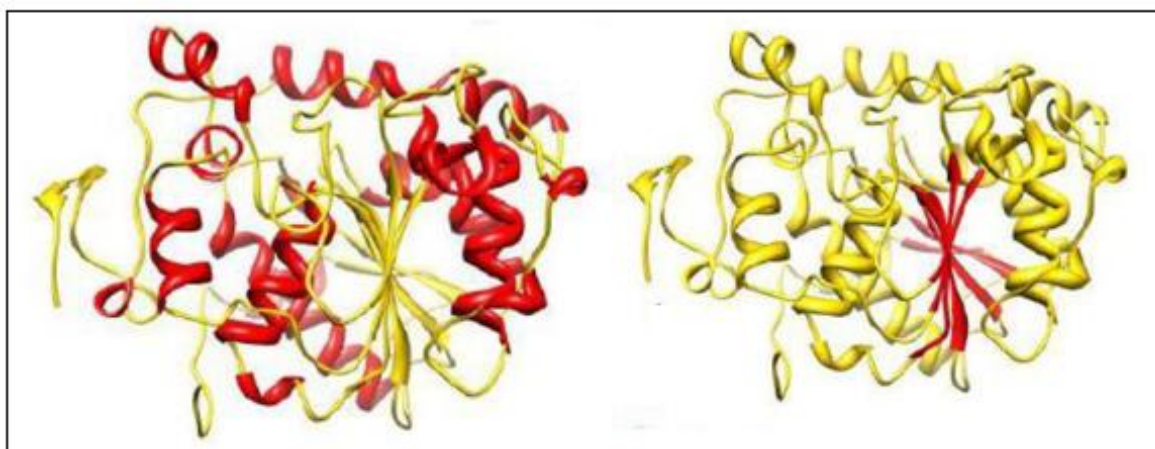


Figura 2. Plegamiento α/β hidrolasa de estructura cristalográfica de la lipasa B de *Cándida antártica*. Tomada y modificada de (Torres, 2009).

C), por lo tanto, requieren una interfaz agua-lípido para su catálisis, mientras que las segundas catalizan principalmente la hidrólisis de enlaces éster de acilgliceroles de cadena corta y media (entre 6 y 8 carbonos como máximo) (Verger, 1997; Ollis *et al.*, 1992; Bornscheuer, 2002). Las enzimas lipolíticas de origen microbiano particularmente se utilizan para diversos procesos industriales, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Aplicación de enzimas lipolíticas en procesos industriales.

Enzima	Aplicación/ Industria	Fuente de origen	Cita
Lipasa	Síntesis de lovastatina	<i>Candida rugosa</i>	Sharma y Kanwar, 2014
Lipolase TM	Industria del detergente	<i>Humicola lanuginosa</i>	Kirk <i>et al.</i> , 2002
Lipasa	Producción de aceites vegetales	<i>Mucor miehei</i>	Li & Ward, 1993.
Lipozima	Síntesis de monoglicéridos	<i>Mucor miehei</i>	Stevenson <i>et al.</i> , 1993.
Lipasa	Degradación de polímeros de polietileno alifático	<i>Pseudomonas spp.</i>	Kellis <i>et al.</i> , 2001.
Lipasa	Industria del detergente	<i>Aspergillus oryzae</i>	Gerhartz, 1990.
Lipasa	Desarrollo del sabor del queso azul	<i>Penicillium roqueforti</i>	Farahat, 1990.
Lipasa	Resolución racémica de ketoprofeno	<i>Serratia marscences</i>	Long <i>et al.</i> , 2007
Esterol esterasa	Industria de la pulpa y el papel	<i>Ophiostoma piceae</i>	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2014

Carboxil esterasa NP	Resolución de (R, S) -ibuprofeno metilester	<i>Bacillus subtilis</i>	Musttranta. 1992; Quax & Broekhuizen, 1994.
Esterasa Lp-1002	Esterificación del alcoholes y ácidos durante el añejamiento del vino	<i>Lactobacillus plantarum</i> (WCFS1)	Torres <i>et al.</i> , 2014
Colesteril esterasa	limpieza de lentes de contacto teñidos con oleato de colesteril, tripalmitina y estearato de estearilo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sugihara <i>et al.</i> , 2002
CL96 esterasa	Industria láctea	<i>Lactobacillus casei</i>	Choi & Lee, 2001
Cinamoil esterasa	Hidrolisis de ácido clorogénico de las paredes celulares de plantas	<i>Lactobacillus helveticus</i> (KCCM 11223)	Song & Baik, 2017
Feruloil esterasa	Síntesis de éster de pentilferulado / industrias de cosméticos y perfumes, decoloración de efluentes de fábricas de papel.	<i>Aspergillus niger</i>	Giuliani <i>et al.</i> , 2001
Pectinex Ultra SP-L (pectin metilesterasa)	Clarificación de los jugos de frutas	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Demir <i>et al.</i> , 2001

1.2 Características bioquímicas y estructurales de las enzimas lipolíticas

Además de la diferencia del largo de la cadena acilo de los sustratos sobre los que actúan, existen otras diferencias entre lipasas y esterasas (Tabla 2). La estructura de algunas lipasas revela que poseen un dominio hidrofóbico semejante a una tapa que cubre el sitio activo y que se relaciona a la activación interfacial particular de estas. Sin embargo, es cierto que no todas las lipasas presentan esta característica, por lo que no se considera una propiedad que distinga claramente a las lipasas de las esterasas. Este fenómeno se presenta cuando hay una fase de triglicéridos o disolvente orgánico hidrofóbico, entonces la tapa se separa, permitiendo el acceso al sitio activo cuando se alcanza una concentración mínima de sustrato (Bornscheuer, 2002).

Tabla 2. Diferencias generales entre lipasas y esterasas (Bornscheuer, 2002).

Propiedad	Lipasa	Esterasa
<i>Sustratos</i>	Insolubles de cadena larga	Ésteres simples
<i>Activación interfacial</i>	Algunas	No
<i>Enantioselectividad</i>	Generalmente alta	Alta o baja
<i>Estabilidad en disolventes</i>	Alta	Alta o baja
<i>Sustrato hidrofóbico</i>	Alta	Alta o baja

Estas enzimas, como otras hidrolasas, presentan la secuencia consenso Gly-X-Ser-X-Gly como motivo distintivo altamente conservado alrededor de la serina del sitio activo, el cual contiene la triada catalítica: Ser-Asp-His (Glu en lugar de Asp para algunas lipasas) (Bornscheuer, 2002; Chu *et al.*, 2008; Holmquist, 2000).

El mecanismo de hidrólisis o formación de enlaces éster es esencialmente el mismo para las lipasas y las esterasas, y se compone de cuatro pasos: primero, el sustrato se une a la serina activa, produciendo un intermedio tetraédrico estabilizado por los residuos catalíticos His y Asp. Luego se libera el alcohol y se forma un complejo acil-enzima. El ataque nucleofílico (agua en hidrólisis, alcohol o éster en transesterificación) forma nuevamente un intermedio tetraédrico, que después de la

resolución produce el producto (un ácido y un éster) y enzima libre (Bornscheuer, 2002; Bornscheuer & Kazlauskas, 2006) (Figura 3).

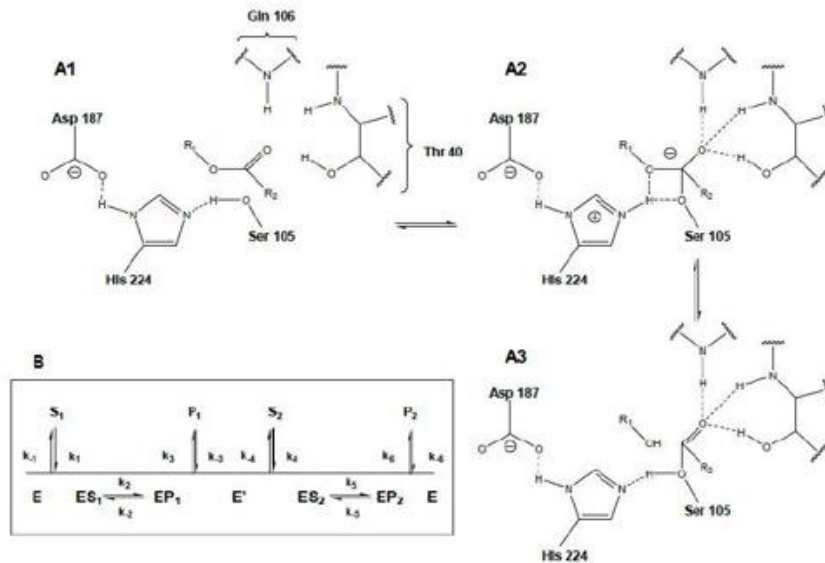


Figura 3. Mecanismo de acción basado en la triada catalítica (Ser105, His224 y Asp187). El intermediario tetraédrico (A2) es estabilizado mediante puentes de hidrógeno (complejo ES). La cavidad de oxianión la conforman: Thr40 y Gln106. El complejo acil-enzima (A3) la serina realiza el ataque nucleofílico al carbonilo de este complejo rompiéndolo. A partir de entonces se genera un nuevo intermediario tetraédrico (A2) para terminar con la liberación del segundo producto y regenerar el sitio activo (A1) (Li *et al.*, 2014).

1.3 Clasificación

En los microorganismos, las enzimas lipolíticas bacterianas se clasificaron originalmente en 8 familias con base en el porcentaje de conservación de las secuencias de aminoácidos y de algunas propiedades biológicas (Arpigny & Jaeger, 1999). Actualmente, encontramos una extensión de la clasificación a 19 familias debido a enzimas recién descubiertas. Dentro de esta clasificación encontramos a la familia IV, conocida como la familia HSL, ya que los miembros de esta muestran una similitud sorprendente en la secuencia de aminoácidos con las HSL de mamíferos en el dominio C-terminal donde se encuentran motivos conservados (Figura 4) (Kovacic, *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2013). Debido a que han sido pocas esterasas pertenecientes a esta familia descritas en hongos, Hernández-Fuentes. (2019) en su tesis de maestría determinó la relación filogenética entre diversas HSL de mamíferos con las de algunos hongos (Figura 5). La presencia de este tipo de

enzimas descritas en diversos organismos sugiere que están ampliamente distribuidas en todos los dominios de la vida.

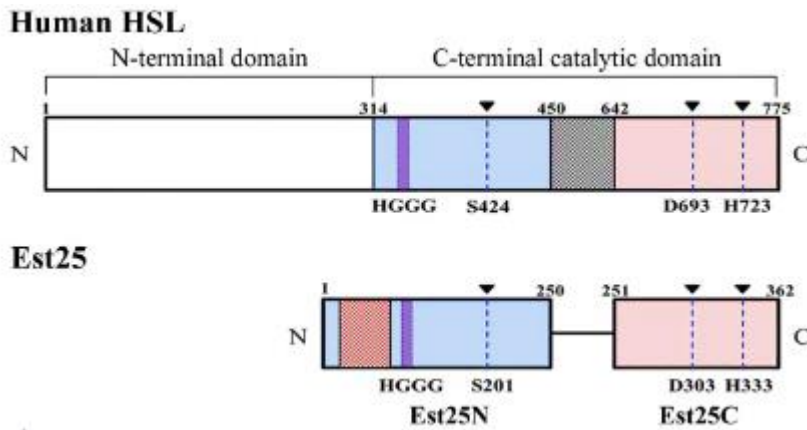


Figura 4. Organización estructural de HSL humana (hHSL) y Est25. En ambas se comparte el dominio C-terminal el cual contiene la triada catalítica (Ser-Asp-His) y el motivo HGGG. El dominio N-terminal es más extenso en la hHSL y en la Est25 perteneciente a la familia IV encontramos un módulo regulador (tomada de Ngo, et al., 2013).

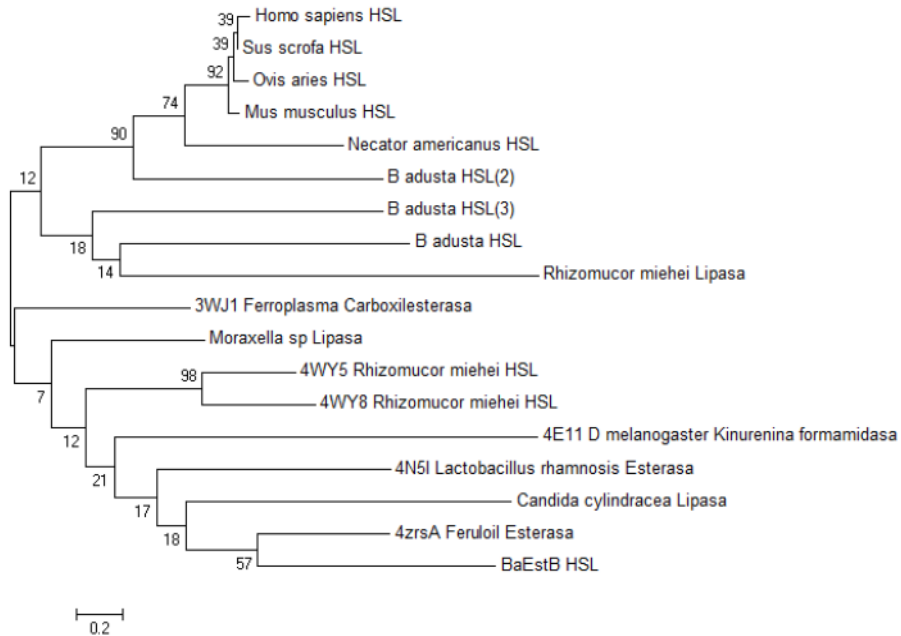


Figura 5. Árbol filogenético de 18 secuencias de aminoácidos de HSL esterases de distintos organismos (mamíferos, hongos y bacterias). Muestra la HSL RmEstB marcada con un triángulo azul. La HSL BaEstB de humanos en la parte inferior y superior respectivamente (Hernández-Fuentes, 2019).

Estas también se clasifican en cuatro grandes bloques (C, H, L y X) de acuerdo con los porcentajes de identidad en la secuencia lineal de aminoácidos y la conservación de motivos particulares. El bloque H es el más pequeño y aquí encontramos a las lipasas HSL (Lenfant *et al.*, 2013; Sánchez-Carbente *et al.*, 2017). Donde la mayoría

de las enzimas de este bloque H resultan ser esterasas. Además, las HSL de microorganismos se dividen en dos subfamilias de acuerdo con la presencia de los motivos GTSAG o GDSAG (Li *et al.*, 2014).

Las HSL resultan atractivas para su uso en diversas aplicaciones biotecnológicas como aditivos en los detergentes, aditivos alimentarios, biorremediación, biocombustibles, y biotransformación, ya que al igual que otras esterasas realizan la catálisis de una amplia gama de sustratos que contienen enlaces éster, tienen alta actividad, alta regio- y esteraselectividad, y una notable estabilidad. En la Tabla 3 se muestran algunas HSL y los productos de síntesis y/o hidrólisis que catalizan (Sánchez *et al.*, 2017; Kim, 2017).

Tabla 3. Sustratos de reacciones de hidrólisis y síntesis de HSL bacterianas (Kim, 2017).

Esterasa HSL	Síntesis	Hidrólisis
AFEST y EST2		<i>p</i> -nitrofenil hexanoato
PsyHSL		<i>p</i> NP- pentanoato
LipN	Butirato de metilo	Acetato de 4- hidroxifenilo
EstDL26 y EstDL136		Cloranfenicol acetilado
Est4 y Est25		Acetato de linalilo y acetato de α -terpinilo

A pesar de tener un número importante de enzimas lipolíticas caracterizadas, el número de sustratos con las que se determina su especificidad es limitado e insuficiente porque no nos permite conocer cuáles son los sustratos naturales de los organismos a partir de los cuáles fueron aisladas. Esto conlleva a que la clasificación de estas enzimas con base a su actividad bioquímica resulte incompleta. Por otra parte, siempre se ha contemplado el largo de la cadena acilo de los sustratos como parte de las diferencias entre lipasas y esterasas, sin embargo, existe poca información de esta índole que relacione el lado alcohol del sustrato respecto a la actividad y/o clasificación. Indagar en estos aspectos nos acercaría a determinar cuáles son los sustratos con los que podríamos obtener la

mejor actividad en enzimas lipolíticas, que en consecuencia podría permitir un mercado novedoso para las industrias de síntesis de compuestos orgánicos.

1.4 *Pichia pastoris* como sistema de expresión heteróloga

Actualmente se encuentran comercialmente disponibles una amplia variedad de sistemas que permiten la expresión de proteínas recombinantes (PR), estas pueden producirse en diversos sistemas biológicos, como bacterias, levaduras y algunas células eucariontes (mamíferos, plantas e insectos).

Los sistemas de expresión bacterianos son los más utilizados, pero tienen algunas limitaciones. Por ejemplo, en *E. coli*, la formación de cuerpos de inclusión en el citoplasma es un problema frecuente, también el mal plegamiento de la proteína y la degradación por proteasas, además que estas no generan modificaciones post-traduccionales necesarias para la actividad de la mayoría de las proteínas de eucariontes (Karbalaei *et al.*, 2020). Por lo cual se han desarrollado otros sistemas de expresión alternos.

Las levaduras tienen un mecanismo de expresión similar a las células de mamíferos, pero estas últimas tienen costosos requerimientos nutricionales, crecen lentamente y es posible la contaminación con virus, lo que limita su uso a gran escala. En cambio, las levaduras tienen ventajas como la velocidad de crecimiento y su fácil manipulación genética, además de que, en contraste con las bacterias, realizan modificaciones pos-traduccionales, excretan PR al medio de cultivo y el ADN linearizado se puede insertar en el genoma con alta eficiencia mediante recombinación cruzada generando líneas celulares estables. Adicionalmente, es posible optimizar los rendimientos de producción modificando parámetros físicos como pH, temperatura, disponibilidad de O₂, así como las concentraciones residuales de metanol (Karbalaei *et al.*, 2020, Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica, utilizada para la producción de proteínas heterólogas. Ésta destaca por tener similitud con sistemas de expresión como las líneas celulares CHO, además de ser un sistema económico con tiempos de expresión relativamente rápidos, y se puede escalar a biorreactores de nivel industrial a partir de pequeños volúmenes de cultivo. La purificación de proteína

recombinante es muy fácil, ya que tiene una producción secretora directamente al medio de cultivo, y ésta presenta proteínas secretoras endógenas limitada (Karbalaeei *et al.*, 2020).

Su capacidad para utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía está dada por la presencia de los genes que codifican para la enzima alcohol oxidasa (AOX), denominados *aox1* y *aox2*. Su expresión es inducida por la presencia de metanol en el medio, aunque ambos genes producen la AOX, el gen *aox1* contribuye con el 90% de producción. Esta característica permite usar como inductor para la expresión de proteínas al metanol.

Esta levadura puede presentar 3 fenotipos de acuerdo con los genes de AOX que estén presentes. En cepas que tienen deletado el gen AOX1, el fenotipo de

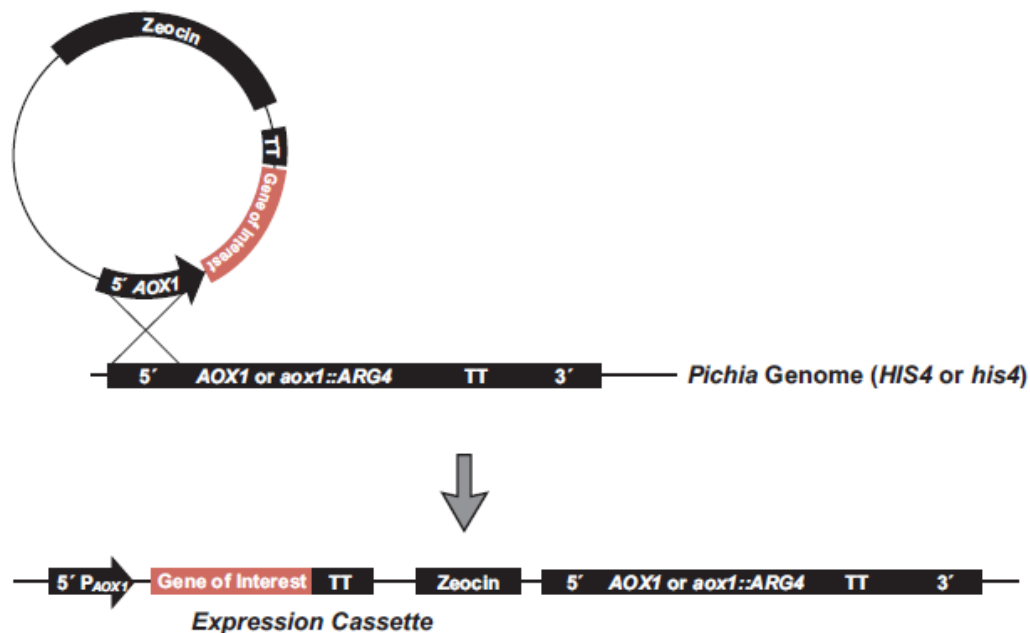


Figura 6. Esquema del resultado de una inserción del plásmido 5' linearizado en el locus AOX1. La inserción en lo loci AOX1 (cepas X-33 o GS115) o *aox1::ARG4* (KM71H) a partir de la recombinação cruzada de los vectores pPICZ o pPICZ α da como resultado la ganancia de PAOX1 seguido del gen de interés y el gen de resistencia a zeocina siendo el fenotipo de la transformante es Mut⁺ (X-33 o GS115) o Mut^s (KM71H).

denomina Mut^s lo cual deriva en una utilización lenta del metanol, por ende, el crecimiento se ralentiza, en cambio si el gen AOX2 se inactiva la tasa de crecimiento es comparable a la cepa salvaje, este es el fenotipo Mut⁺, si se desactivan ambos genes las cepas no pueden crecer en metanol (Mut⁻). Es por eso por lo que los vectores de expresión permiten la recombinação en el loci AOX1 (Figura 6)

Otra ventaja que destaca en *P. pastoris* es su capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales necesarias en proteínas utilizadas con fines terapéuticos, tales como la glicosilación ligada a O y N, y la formación de puentes disulfuro. Gracias a esto, se obtienen proteínas recombinantes con un plegamiento, solubilidad, estabilidad y actividad biológica adecuada. Así mismo, *P. pastoris* tiene la ventaja de glicosilar proteínas secretadas, pero sin la hiperglicosilación que presenta *Saccharomyces cerevisiae*. Esta última glicosila a los N con largas cadenas de Man > 50GlcNAc2 (Figura 7 b), teniendo en los oligosacáridos centrales enlaces glucano α -1,3 mientras que en *P. pastoris* los oligosacáridos suelen ser más cortos y no tiene enlaces α -1,3 terminal (Figura 7 a). Por esto, las proteínas recombinantes producidas con *S. cerevisiae*, pueden ser inmunogénicas, lo que las hace particularmente inadecuadas. (Cereghino *et al.*, 2002; Karbalaei *et al.*, 2020).

Sin embargo, también es conocido que la hipermanosilación de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, pueden provocar reacciones inmunológicas y una vida media sérica disminuida (Laukens, De Wachter y Callewaert, 2015). Actualmente existen cepas como Pichia GlycoSwitch® que tienen mutado al gen que codifica a la α -1,6-manosiltransferasa (OCH1), la que es responsable del inicio de la hipermanosilación. Para la producción de glicoproteínas de tipo humano, el siguiente paso con esta cepa es la sobreexpresión de varias glicosiltransferasas o glucosidasas.

Este sistema también tiene algunas desventajas: 1) a diferencia de un sistema bacteriano, el número de transformantes de *P. pastoris* por μ g de ADN es de 10^3 - 10^4 vs las que se obtienen en *E. coli* (10^8 - 10^{11}), por lo que se requieren grandes cantidades del plásmido (S. Wu & Letchworth, 2004). Otra limitación en la transformación es que *P. pastoris* tiene pocos marcadores de selección para auxotrofia, entre los que se incluyen *his4*, *arg4* y *Shble*, éste último necesario para resistir contra el antibiótico Zeocina (Cereghino & Cregg, 1999). Por lo que es muy común la contaminación con hongos y bacterias saprófitas en el medio de expresión, en donde las proteasas secretadas por estos organismos llegan a hidrolizar la PR secretada en el sobrenadante (Stewart, 2015).

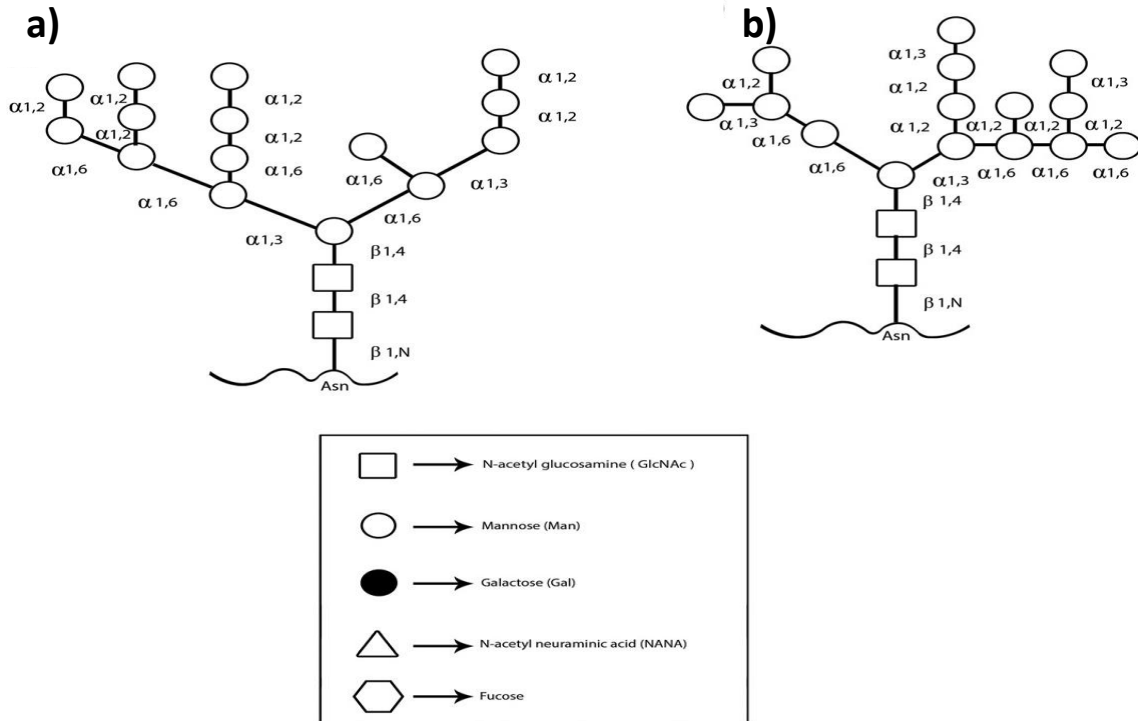


Figura 7. Diagrama esquemático de la estructura de N-gucano en (a) *Pichia pastoris*, que tiene una estructura de N-gucano generalmente del tipo Man8-14GlcNAc2 con una estructura ramificada triantenaria, y b) *Saccharomyces cerevisiae*, encontramos una estructura de N-gucanos hipermanosilada. En ambas estructuras encontramos que los oligosacáridos se unen al residuo amida de una asparagina a través del enlace N-glicosil dentro de la secuencia consenso Asn-X-Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto prolina). Tomada y modificada de: (Karbalaei et al., 2020).

Adicionalmente, los vectores para *P. pastoris* tienen además del promotor de la AOX (PAOX1) del gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (PGAP). Sin embargo, de estos promotores el único inducible con metanol es el PAOX1 cuya concentración añadida va del 0.5 %- 2.5 %, de acuerdo con las instrucciones del kit de expresión EasySelect™ *Pichia* de Invitrogen. Donde concentraciones mayores a 5% son tóxicas para las células por lo que se detiene la producción de PR (Rajamanickam et al., 2017).

Aunque *P. pastoris* es un sistema fácil de utilizar, requiere de cierto grado de optimización para lograr la producción máxima de proteína. Las variables por considerar son la concentración de metanol y sorbitol, el fenotipo Mut que presentan, la temperatura y el tiempo de incubación, este último puede variar entre cepas y de la proteína que se expresa Algunos estudios sugieren que la expresión

óptima de proteínas se produce entre las 72 y 96 horas de incubación (Karbalaeei *et al.*, 2020).

2. ANTECEDENTES

A pesar de que algunas HSL bacterianas han sido caracterizadas estructural y bioquímicamente, hasta la fecha en organismos fúngicos solo han sido descritas 3 enzimas lipolíticas de la familia HSL, dos del hongo termófilo mucoral *Rhizomucor miehei* (*RmEstA* y *RmEstB*) y una de la levadura psicrófila *Glaciozyma antártica* designada como *GlaEst12*, que tienen especificidades de sustrato distintas. *RmEstA* cataliza la ruptura de ésteres con cadenas de 4 y 6 carbonos mientras que la *GlaEst12*, mostró una alta especificidad hacia ésteres de *p*-NP con cadenas de 8 y 10 carbonos (Liu *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015; Mohamad *et al.*, 2020).

Otras enzimas lipolíticas fúngicas han sido aisladas de *Candida antarctica*, *C. rugosa* y hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Rhizopus orizae*, *Penicillium camembertii*, entre otros, las cuales han sido caracterizadas y comercializadas para las industrias lácteas, petroleras y de grasas. Sin embargo, aún falta mucho por investigar acerca de los sustratos celulares de las enzimas lipolíticas de la familia HSL en hongos y su papel fisiológico aún es incierto. El conocimiento de la especificidad de estos sustratos podría dar pauta para proponer el uso de estos en la síntesis o hidrólisis de nuevos compuestos de interés industrial (Anobom *et al.*, 2014; Borrelli & Trono, 2015; Houde *et al.*, 2004).

En el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología UAEM se realizó la caracterización bioquímica de una esterasa HSL (*BaEstB*), obtenida de una librería de cDNAs del basidiomiceto *Bjerkandera adusta* crecido en petróleo crudo. El cDNA de esta tiene un tamaño de 969 nucleótidos, mientras que el gen es de 1133 nucleótidos, con dos exones y tres intrones de 57, 50 y 57 nucleótidos

Esta esterasa HSL fue clonada en el vector pPICZ α para ser expresada heterológamente en *Pichia pastoris* (Figura 8). El vector permite agregar a la proteína de interés una bandera de histidinas en el carboxilo terminal, y gracias a tener el péptido señal del factor de apareamiento de la levadura, las proteínas pueden ser secretadas al medio de cultivo (Higgins, 2007).

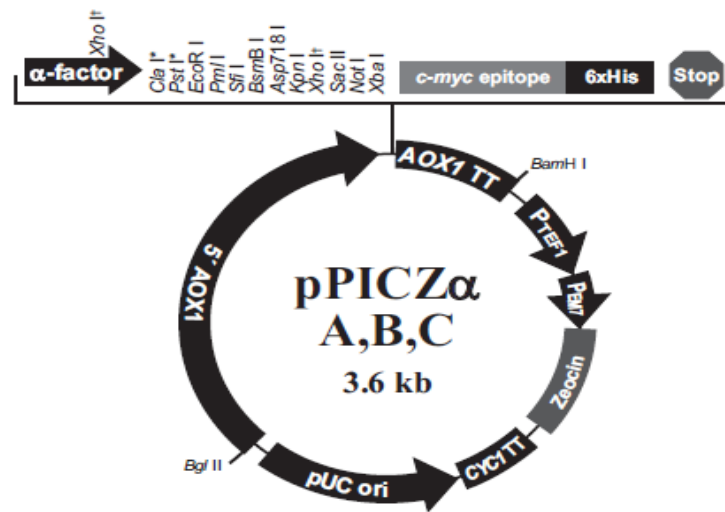


Figura 8. Características de los vectores pPICZ α A, B y C. Dentro del sitio de clonación múltiple se encuentran el factor α que codifica para el péptido señal de secreción al medio, 10 sitios de restricción, etiqueta de epítopo myc C-terminal, etiqueta de polihistidina. Además del ORF para el gen *Shble* que confiere a las transformantes resistencia a la zeocina

De acuerdo con los análisis bioquímicos esta tiene una actividad óptima a 45 °C y a un pH de 7.0 cuando se utiliza el 2-naftil acetato como sustrato disminuyendo su actividad hasta 18 veces frente al *p*-NP acetato (2C), 32 veces con el *p*-NP butirato (4C), mientras que con sustratos de cadena larga como el *p*-NP decanoato (10C) y *p*-NP palmitato (16C) no tuvo actividad (Sánchez-Carbente *et al.*, 2017). En este trabajo se propuso que la especificidad de la enzima podría verse influenciada por la presencia de los anillos que componen al sustrato en la parte del alcohol, ya que el acetato de 2-naftilo tiene 2 anillos mientras que los ésteres *p*-NP solo tienen uno. Es importante resaltar que el acetato de 2-naftilo y el acetato de *p*-nitrofenilo tienen el mismo largo de cadena, sin embargo, la actividad de la enzima disminuye con el segundo. Existen otras enzimas que de igual manera requieren sustratos voluminosos en el extremo del alcohol, como una xilano esterasa la cual tuvo mejor

actividad en presencia de una cadena de xilano esterificada vs un sustrato como un éster de *p*-NP (Sánchez-Carbente *et al.*, 2017).

El modelado tridimensional y el análisis filogenético demostró que *BaEstB* es un ortólogo de la *RmEstB*. De acuerdo con el análisis estructural, la similitud de aminoácidos y la conservación de motivos particulares se estableció que *BaEstB* pertenece a la familia IV (HSL). Se identificó a la triada catalítica típica de las esterasas y lipasas (Ser-His y Asp-Glu) a partir de alineamientos múltiples de aminoácidos y se obtuvo el modelo de la estructura tridimensional de *BaEstB* obtenido por Quimera donde se observa el plegamiento α/β hidrolasa compuesto en este caso por 8 hojas β plegadas rodeadas por 10 α hélice (Figura 9).

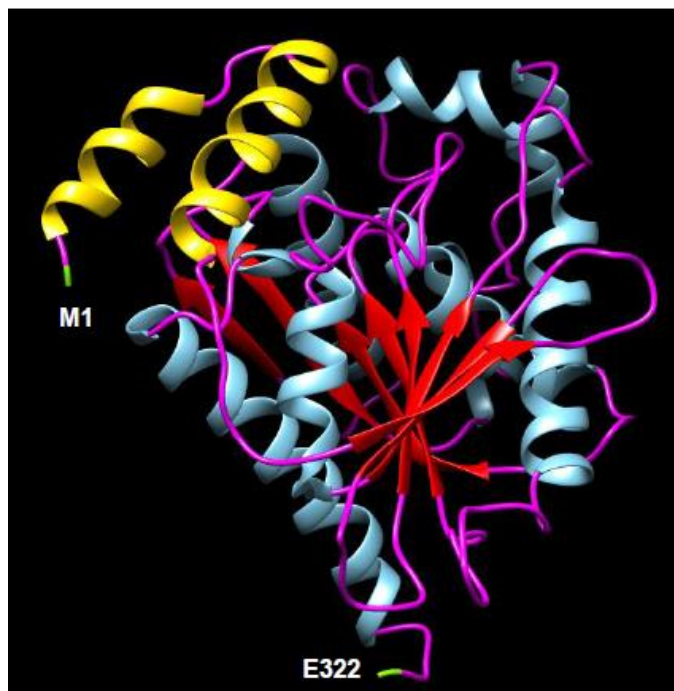


Figura 9. Estructura tridimensional de la *BaEstB*. M1 pertenece al residuo amino terminal y E322 al carboxilo terminal, en rojo se muestran las láminas beta rodeadas de hélices alfa en azul, conectadas por un loop que conforman el dominio Cap (Hernández-Fuentes, 2019).

En los mamíferos se ha descrito que las HSL utilizan una amplia gama de sustratos como ésteres de retinilo y ésteres de colesterilo, estos últimos sirven como precursores en la síntesis de hormonas (Ali *et al.*, 2012). Mientras que los hongos no tienen colesterol sino ergosterol, sirviendo de almacén encontrándose en su forma esterificada en gotas citoplásmicas (Welte, 2009) De acuerdo con lo conocido

en mamíferos y la actividad diferencial entre el 2-naftil acetato y el *p*-NP acetato, se hipotetizó que el ergosterol esterificado podría ser el sustrato de la *BaEstB*.

Para comprobar si esto es posible, se realizó un análisis *in silico* de la preferencia de la *BaEstB* por el ergosterol esterificado y otros sustratos analizados previamente a través de “Docking” o acoplamiento molecular. El análisis mostró que el ergosterol acetilado se enlaza de manera termodinámicamente favorable al sitio activo de la *BaEstB*, seguido del colesterol acetilado y en menor medida al 2-naftil acetato. Además, se demostró por HPLC que efectivamente la enzima cataliza la desesterificación de este sustrato (Tabla 4 y Figura 10).

Por otro lado, se sabía que la mutación de aminoácidos en la entrada del túnel de *RmEstB* cambiaba su preferencia por sustratos acilo con cadenas más largas. Por tanto, se analizó a través de acoplamiento molecular las mutantes de la *BaEstB* en aminoácidos relevantes en la entrada al sitio catalítico y se determinó que estas mutaciones pueden cambiar la preferencia de la enzima hacia sustratos de diferente número de carbonos en la cadena acilo y distinto volumen en los anillos del lado alcohol de las moléculas como se demostró con mutantes de la *RmEstB* de *R. miehi*.

Las mutantes propuestas se generaron a través del análisis de los residuos de aminoácidos que podrían participar en la unión de sustratos con cadenas de acilo largas (>4C) y se determinó que las mutantes (Y81S y L211W) son las candidatas para probarlas en una fase experimental *in vitro*, de acuerdo con la energía de unión de los sustratos probados (Yang *et al.*, 2015; Hernández-Fuentes, 2019).

Tabla 4. Resultados del ensayo de actividad esterasa de la *BaEstB* frente a ergosterol esterificado con diferente concentración de la enzima.

Tratamientos	Area bajo la curva	Concentración de sustrato (mg/mL)	Concentracion de producto
Control	40.684 ± 2.385	0.421 ± 0.02	0%
<i>BaEstB</i> (100 ng) + S	26.684 ± 6.519	0.298 ± 0.01	29.20%
<i>BaEstB</i> (200 ng) + S	13.966 ± 2.0	0.166 ± 0.06	60.50%

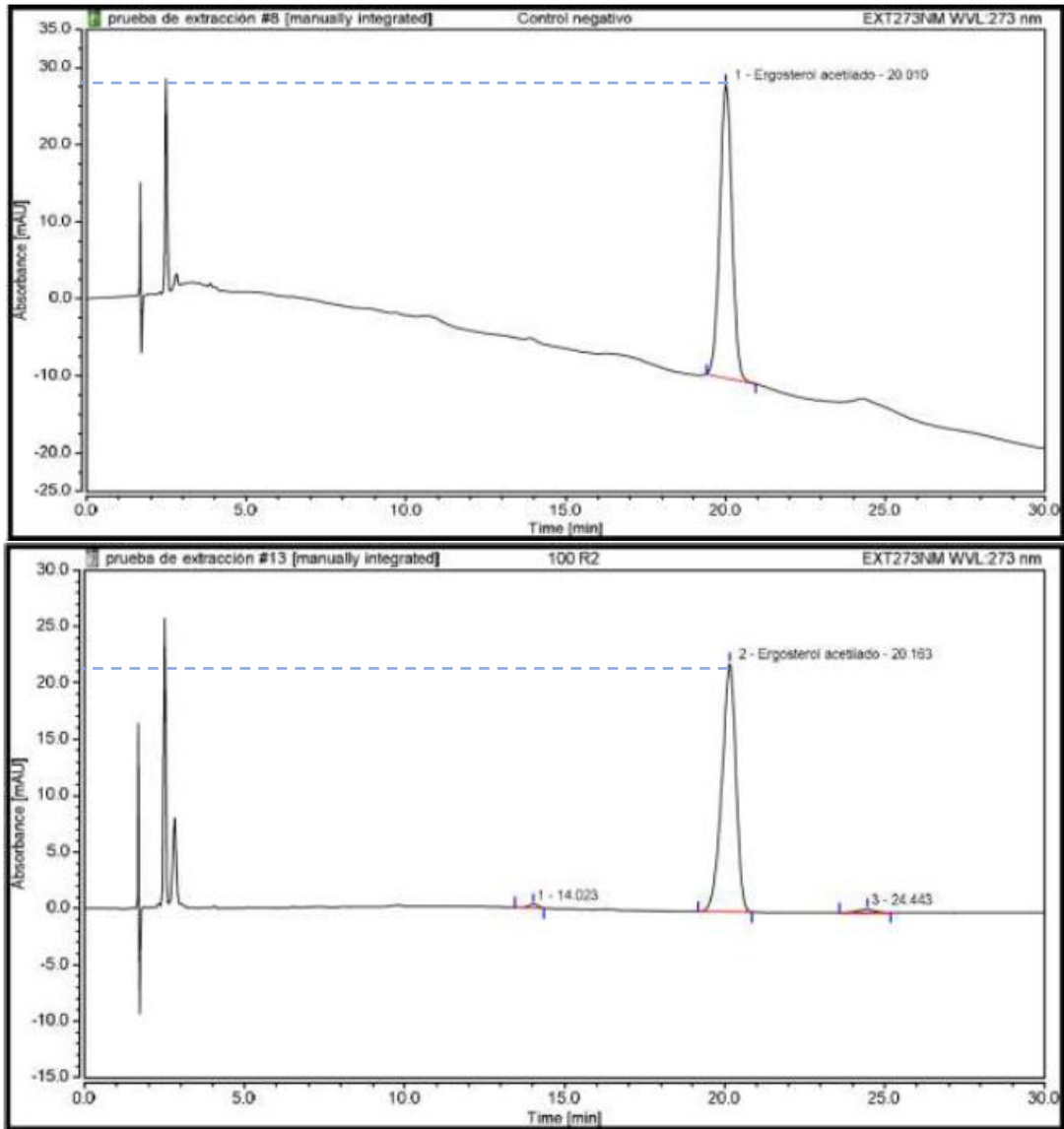


Figura 10. Cromatogramas control (arriba) y tratamiento con 100 ng de BaEstB purificada (abajo). El tratamiento con la BaEstB tuvo un área bajo la curva menor que el control, esto indica que el ergosterol acetato fue hidrolizado por la enzima, teniendo una concentración del sustrato sin hidrolizar de 0.298 mg/mL

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de las HSL esterases ha sido poco explorado en las industrias, pero tienen el potencial de ser empleadas en sectores como el de detergentes, aditivos alimentarios, farmacéutica, química fina, biorremediación y biocombustibles. Particularmente, poco se ha explorado en cuáles podrían ser los sustratos naturales de estas y de su especificidad frente a estos.

A través de un análisis de dinámica molecular de la HSL *BaEstB* se determinó que esta tiene más afinidad por el ergosteroil acetato, luego al colesteroil acetato y es menos a fin al 2-naftil acetato. Esto indica que la preferencia de la enzima por el sustrato no sólo depende del largo de la cadena del acilo, sino que también el tamaño del lado alcohol es relevante.

Además, con la misma técnica, se identificaron los residuos de aminoácidos que interactuaban con los sustratos analizados, y por una búsqueda bibliográfica se encontraron estudios de mutaciones de aminoácidos puntuales probadas experimentalmente los que estuvieran implicados en la unión del sustrato y que pudieran coincidir con los residuos que hemos identificado. Los resultados del análisis *in silico* de las mutaciones puntuales mostraron que la mejor energía de unión se presentó con las mutantes Y81S y L211W frente al ergosteril acetato > 2-NA, > *p*-NPA > *p*-NPB > *p*-NPD.

También se demostró que el túnel de entrada al sitio catalítico se agranda cuando se generan las mutaciones Y81S y L211W, por lo que es posible que la enzima pueda entonces usar sustratos voluminosos y con cadenas acilo más largas. Estas predicciones requieren ser validadas experimentalmente, lo que por un lado nos permitiría tener variantes de las enzimas con potencial industrial y por otro lado nos permitirá generar hipótesis de su actividad biológica en el hongo.

4. HIPOTESIS

Las mutantes de la HSL *BaEstB* en los residuos Y81S y L211W desesterificarán sustratos con aril-alcoholes y cadenas acilo mayores a 2C respecto a la *BaEstB* silvestre.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Analizar y comparar la actividad esterasa de las mutantes Y81S y L211W frente a la *BaEstB* silvestre.

5.1.1 Objetivos específicos:

- 1.- Expresar heterológamente y purificar a la HSL *BaEstB* silvestre.
- 2.- Expresar heterológamente las líneas mutantes Y81S y L211W.
- 3.- Obtener los parámetros cinéticos de la HSL *BaEstB* silvestre frente al 2-naftilacetato y *p*-nitrofenil acetato.

6. METODOLOGÍA

6.1 Generación de Mutantes

Se diseñaron los oligonucleótidos sentido y antisentido para obtener las mutaciones de los residuos Y81 y L211 (Figura 11), y llevar a cabo la mutagénesis de sitio dirigida por PCR-All around con el kit comercial QuikChange Lightning Multi Site-Directed (Agilent Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó como templado el plásmido parental metilado pPICZ α A::*BaEstB* wt y posteriormente se realizó la digestión del DNA parental con la enzima Dnpl que es dependiente de DNA metilado.

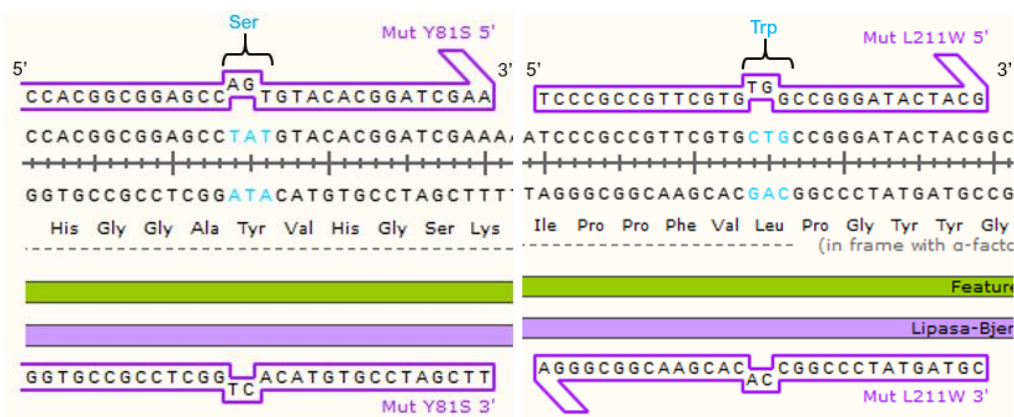


Figura 11. Fragmentos de la secuencia de *BaEstB*. Las bases en azul representan el codón codificante silvestre. Las bases encerradas en morado representan los primers que insertarán los codones que codifican el residuo de aminoácido señalado en corchete.

La transformación en *E. coli* 1116 calcio competentes con ambas construcciones con los cambios predichos previamente digeridas, se realizó por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989), después de la recuperación se tomaron 400 μ L para sembrar en medio LB bajo en sales suplementado con Zeocina® a 25 μ g/mL. Las

placas se, incubaron a 37°C toda la noche (overnight) y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Se seleccionaron 4 colonias recombinantes con el plásmido pPICZαA::BaEstB_L211W y 3 colonias de pPICZαA::BaEstB_Y81S, y se resembraron en placas frescas, además se inocularon 3 mL de medio LB bajo en sales con Zeocina® a 25 µg/mL, incubándose a 37 °C durante 16 horas y los tubos con medio líquido se agitaron a 150 rpm en la oscuridad. Las placas se almacenaron a 4 °C.

6.2 Clonación, secuenciación y transformación

A partir de las colonias seleccionadas se extrajo DNA plasmídico con el kit (Zymo PURE plasmid Miniprep), el cual se secuenció en la Unidad de Secuenciación del IBt-UNAM para confirmar la presencia de las mutaciones, utilizando el oligonucléido AOX1 5´ y 3´ para Y81S y L211W, respectivamente. Una vez que se seleccionó y secuenció la clona con las mutantes deseadas (colonia 3 de la mutante Y81S y colonia 4 de la mutante L211W), las células transformadas se mantuvieron en glicerol al 20% a una temperatura de -80 °C hasta su posterior uso. A partir de estos gliceroles se resembraron para posteriormente hacer una purificación del plásmidos esta vez por el método de fenol:cloroformo. Una vez que se obtuvieron los plásmidos de ambas mutantes, se procedió a linearizar con la enzima ScaI, el plásmido lineal se precipitó y cuantifico para finalmente ser transformado en *P. pastoris* X-33 mediante electroporación.

Para preparar a las células electrocompetentes de la cepa X-33 de *P. pastoris* se realizó un preinóculo en 5 mL de medio YPD, que se dejó incubar por aproximadamente 10 horas a 28°C a 200 rpm. Se tomaron 100 µL de este precultivo para inocular 50 mL de YPD por duplicado y se incubaron en las mismas condiciones, hasta que se alcanzó una densidad óptica entre 1.3 y 1.5. Al día siguiente se realizaron las mediciones de densidad óptica a 600 nm por triplicado. se recolectaron las células, para posteriormente realizar lavados con agua estéril y finalmente resuspender en sorbitol (preparación para electroporación).

Se transformó por electroporación células electrocompetentes de *P. pastoris* X-33, mezclando 80 µL de las células con alrededor de 5 a 20 µg (ver Tabla 13) de las dos construcciones con los cambios predichos, se pusieron en las cubetas y se pasó una corriente de 2000 V (equipo Eppendorf Eporator®), al finalizar el equipo registró una tensión real de 1950 V para ambas construcciones y 5.9 ms para la cubeta con la construcción pPICZαA::BaEstB_L211W y 5.8 ms para pPICZαA::BaEstB_Y81S. Por último, las células se sembraron en placas con medio levadura-peptona-dextrosa (YPD) adicionando 100 µg/mL de Zeocina®.

6.3 Selección de las líneas mutantes HSL BaEstB Y81S y L211W

Se seleccionaron dos colonias de cada transformante para confirmar la integración de las construcciones en el genoma de *P. pastoris* X-33, a través de PCR de colonia. Se utilizaron los oligonucleótidos AOX1 5' y 3' del kit de expresión EasySelect™ *Pichia* Expression Kit de Invitrogen™ con el programa que se indica en la Tabla 5. Los amplicones se secuenciaron para cerciorarnos de que el producto amplificado contiene las mutaciones generadas. Las secuencias y oligos utilizados para el PCR (AOX1) y para la reacción de secuenciación (Lip Rv) se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 5. Programa PCR con oligos AOX1 5' y 3'.

1 ciclo	95 °C	5 minutos
30 ciclos	95 °C	45 segundos
	57 °C	1 minuto
	72 °C	2 minutos
1 ciclo	72 °C	5 minutos

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos utilizados.

Oligo	Secuencia
AOX1 5'	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
AOX1 3'	GCAAATGGCATTCTGACATCC
Lip Rv	TCTAGACCTTCCGTCGCTGGTACG

6.4 Inducción y expresión de *BaEstB* silvestre

Se sembraron 50 μ L del glicerol de *Pichia pastoris* *BaEstB* silvestre (wt, por sus siglas en inglés) en placas de YPD con 100 μ g/mL de Zeocina®. De las colonias obtenidas, se inocularon dos de estas y una del control negativo (*Pichia* X-33 transformada con el vector pPICZ α A vacío) en 15 mL de medio complejo tamponado con glicerol (BMGY) en matraces de 50 mL a 28°C en agitación (200-250 rpm) hasta alcanzar una DO_{600nm} de 2-6 (16 a 18 horas). Después las células se centrifugaron a 1500 g por 5 minutos y se resuspendieron en 50 mL de medio complejo fresco tamponado con medio metanol (BMMY) en matraces de 250 mL a 28°C, 200-250 rpm.

Para inducir la expresión de la *BaEstB* silvestre se añadió metanol a una concentración final de 0.5% durante 4 días a intervalos de 24 horas (Cereghino *et al.*, 2002).

6.4.1 Inducción *BaEstB* mutantes

Como primer paso para lograr una inducción eficiente, se realizó un análisis de los sobrenadantes de cultivo en medio de inducción mediante un gel SDS-PAGE. Al no encontrar alguna banda definida que indicara una expresión a diferentes días, como alternativa dicho análisis se observó mediante el método dot blot de colonia (inmunoensayo).

Se inocularon placas de agar suplementadas con medio BMM (0.34% de YNB, 1% de sulfato de amonio, 0.5% de metanol, 4x10⁻⁵% de biotina en buffer fosfatos 0.1 M), con una colonia de las cepas de *P. pastoris*: pPICZ α A, *BaEstB* wt, *BaEstB*_Y81S y *BaEstB*_L211W. Para inducir la expresión de las proteínas, se colocaron 3 mL de metanol al 0.5% en la tapa de las placas, y cada 24 h. se volvía a colocar metanol. Estas placas se mantuvieron boca abajo y se incubaron a 28 °C durante 3 días. Se hicieron réplicas de estas placas para ir tomando una cada 24 horas hasta completar 72 h.

Cada 24 horas, se colocó una membrana de nitrocelulosa sobre las colonias durante dos horas a 28 °C. Posteriormente se lavaron las membranas con agua y buffer TBST 1x y después se incubaron por una hora con en buffer de bloqueo (leche al

3% en TBST 1x) y agitación constante. El buffer se retiró y posteriormente se incubó durante 2.5 horas con 0.36 mg/μl del anticuerpo primario (anti-Myc dilución 1:3500). las membranas se lavaron 3 veces con TBST 1x y entonces, se agregó el anticuerpo secundario (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076, Cell Signaling, Technology® acoplado a la peroxidasa de rábano) a una dilución 1:2000 en buffer de bloqueo, y se incubó por 1.5 horas a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se lavó 3 veces con TBST 1x durante 5 minutos en agitación y entonces se transfirió a una solución que contenía los sustratos para la peroxidasa de rábano (1.5 mL de luminol y 1.5 mL de peróxido, de acuerdo con las instrucciones del proveedor) (Millipore kit No. WBKLS0) y se dejó reaccionar durante 1 min. Finalmente, se reveló en un escáner de transferencia C-DIGIT marca LI-COR® en el IBT (Instituto de Biotecnología de la UNAM).

6.4.2 Análisis de inducción y detección de actividad

Para visualizar la inducción de la *BaEstB* wt, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) según el método de Laemmli (1970), utilizando fracciones de todos los pasos de inducción: desde el sobrenadante obtenido en distintas horas (24, 48, 72 y 96) después de la inducción, y las fracciones obtenidas en el proceso de purificación a distintos tiempos. Para detectar a las proteínas en el gel, estos se tiñeron con azul de Coomassie brillante R-250, y se esperaba observar una banda enriquecida a la altura 36.9 kDa peso que corresponde a la *BaEstB*. Para detectar la actividad de la *BaEstB* wt se utilizó el sobrenadante de los cultivos para realizar el ensayo de actividad esterasa con el sustrato el 2-NA. La actividad esterasa de los sobrenadantes, se considerará como positiva por el cambio de coloración de amarillo a rojo. Lo que indica la aparición de producto (2- naftol).

6.5 Purificación y ensayos de actividad esterasa

La purificación de la *BaEstB* se realizó por una cromatografía de afinidad a níquel. Se centrifugó un cultivo de 50 mL a 1500 x g durante 15 minutos en tubos de ultrafiltración de 15 mL Amicon® Ultra de 10 kDa para concentrar el sobrenadante hasta un volumen de 1-1.5 mL. Posteriormente, este concentrado se llevó a un

volumen de 15 mL con Buffer Tris-HCl (10 mM, pH 7, 0.2% Tritón) y se aplicó a una columna de afinidad a histidinas HiTrap Chelating HP utilizando una bomba peristáltica para posteriormente eluir a la *BaEstB* con Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, con 0.3 M Imidazol. Finalmente se eliminó el imidazol usando un filtro con un corte de 10 kDa (Amicon Ultra MILLIPORE con una membrana de celulosa) por centrifugación a 5500 rpm hasta obtener un aproximado de 0.75-0.5 mL. La enzima purificada se almacenó en buffer Tris-HCl 10 mM pH 7 con glicerol al 20 % a una temperatura de -20°C hasta su uso.

6.5.1 Cuantificación de proteína por método de Bradford

Se utilizó el método de Bradford para determinar la concentración obtenida del sobrenadante, las fracciones de elución y de la enzima pura. El reactivo de Bradford se diluyó en una relación 1:4 con agua destilada. Antes de cuantificar a las muestras, se realizó una curva de concentración con albúmina de suero bovina (BSA, 0.1mg/mL) en el rango de 0.5 a 6 µg/mL. Para la cuantificación de la muestra, se tomaron 2 µL a los que se añadieron 98 µL de agua destilada y 900 µL del reactivo de Bradford. Como blanco se utilizaron 100 µL de agua destilada y 900 µL del reactivo de Bradford. Todas las muestras leyeron por triplicado en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

6.5.2 Ensayos de actividad hidrolítica

Una vez que se obtuvo a la *BaEstB* wt se realizaron ensayos para determinar los parámetros cinéticos de la enzima con los sustratos previamente utilizados: el 2-naftil acetato (2-NA) y el *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA).

Esta actividad se determinó por colorimetría de la siguiente manera:

Solución 1: 2-naftilo acetato stock de 200 mmol/L en acetona.

Solución 2: 10 mg de sal de sulfato GBC de Garnet disueltos en 100 µl de tampón de fosfato de potasio 50 mmol/L a pH 7 y Triton X-100 al 0,1% (para la preparación de sustrato).

Solución 3: mezcla de 10:0.01:0.05 (v /v /v) tampón fosfato (pH 7.0) 0.1 % de Triton X-100/ solución 2/ solución 1.

La solución 2 se debe preparar en el momento para evitar la precipitación de la sal de sulfato. Para llevar a cabo la medición, se agregaron 10 μL de enzima pura (5 ng/ μL : 50 ng totales) disuelta en tampón Tris-HCL 10 mM pH 7.0, 190 μL de solución 3 y completar el volumen a 300 μL con Tris-HCL 10 mM pH 7.0. Para determinar los parámetros como la K_m y V_{max} experimental, se cuantificó el producto del sustrato hidrolizado (2-naftol) usando distintas concentraciones (0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.5, 0.75 y 1 mM), en intervalos de 10 segundos, durante 15 minutos. Primero se determinó la velocidad inicial para cada concentración con el fin de graficar V_o vs $[S]$. Posteriormente se aplicaron los modelos lineales de Lineweaver-Burk, Hannes-woolf y Eadie-Hofstee para determinar el modelo más adecuado para obtener K_m , V_{max} la y K_{cat}/K_M a partir de los datos experimentales obtenidos.

Se considera una unidad de actividad esterasa a la cantidad de enzima que genera 1 μmol de 2-naftol/*p*-nitrofenol por minuto. Para obtener estas unidades de actividad, se utiliza el coeficiente de absorción molar de 23,598 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para el 2 naftol y 17,800 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 410 nm para el *p*-nitrofenol (*p*-NP).

Por último, se utilizaron las siguientes fórmulas para el cálculo de actividad volumétrica (AV) y específica (AE), respectivamente.

Ec 1:

$$AV = \frac{(m * Vt)}{(\epsilon * b * Ve)}$$

Ec 2:

$$AE = \frac{AV}{[proteína]}$$

En donde:

m = pendiente (Δ Abs/min)

Vt = Volumen total de la reacción

ϵ = Coeficiente de extinción molar de cada sustrato.

b = Longitud de la celda = 1 cm

Ve = Volumen de la enzima

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de plásmidos pPICZ α A::*BaEstB*_Y81S y pPICZ α A::*BaEstB*_L211W

7.1.1 Purificación del plásmido pPICZ α A::*BaEstB*

Con el fin de obtener una cantidad considerable de plásmido se realizó la transformación de células XL1-Blue por el método de electroporación con la construcción pPICZ α A::*BaEstB* silvestre (wt). Una vez transformadas y recuperadas se realizó la resiembra de 5 colonias para inocularlas en medio LB bajo en sales con Zeocina® (25 mg/mL). Posteriormente se realizó la purificación del plásmido con el kit Zymo PURE plasmid Miniprep y se cuantificó por espectrofotometría una longitud de onda de 260 nm (Epoch). Por último, se llevó a cabo la digestión de este plásmido con las enzimas y las condiciones indicadas en la Tabla 7 por duplicado durante 2 horas a 37°C para verificar mediante el tamaño del fragmento que corresponde al inserto que codifica para la *BaEstB* (~974) (Figura 12).

Tabla 7. Reacción de digestión con EcoRI y XbaI que cortan al inicio y término del inserto que codifica para la *BaEstB* wt.

3 μ L	Plásmido pPICZ α A:: <i>BaEstB</i> (~400 ng)
2 μ L	Buffer Tango 10x Thermo Scientific™
0.5 μ L	EcoRI (10 U/mL) Thermo Scientific™
1 μ L	XbaI (10 U/mL) Thermo Scientific™
3.5 μ L	Agua
10 μL	Total

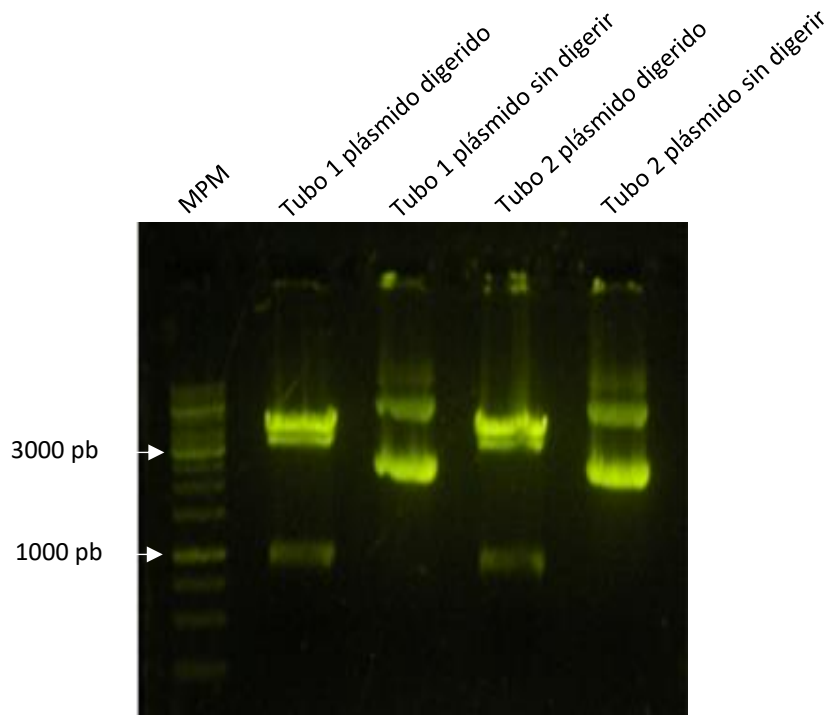


Figura 12. Análisis del patrón de digestión con *EcoRI* y *XbaI* de la construcción pPICZαA::BaEstB y análisis de integridad. Gel de Agarosa al 1%. MPM: 1 kb fermentas.

En la Figura 12 se observa el patrón de digestión del plásmido pPICZαA::BaEstB wt en el que se obtienen dos fragmentos ~ 974 pb y de 3526 pb, el primero que corresponde a la secuencia de la *BaEstB* y el segundo al vector. Se determinó la concentración a partir de la purificación de dos colonias y los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones del plásmido pPICZαA/*BaEstB* purificado por duplicado.

	Tubo 1 pPICZαA::BaEstB	Tubo 2 pPICZαA::BaEstB
Concentración (ng/μL)	270.971	289.42
260/280	2.035	2.075

7.1.2 Diseño de los oligonucleótidos para generar a las mutantes Y81S y L211W

El primer paso para la generación de los plásmidos pPICZαA::BaEstB_Y81S y pPICZαA::BaEstB_L211W, fue el diseño de un par de cebadores para cada

mutación puntal. Esto se realizó por separado a partir de la secuencia del plásmido pPICZαA::BaEstB, utilizando el programa de QuickChange disponible en línea en www.agilent.com/genomics/qcpd. Con las siguientes especificaciones:

- La sustitución deseada debe estar en medio del cebador con 10 a 15 bases aproximadamente de secuencia complementaria al templado silvestre.
- Deben de tener un contenido mínimo de GC del 40 % y terminar en G o C.
- Se buscó una longitud de entre 25 y 45 pares de bases, con una temperatura de fusión (T_m) $\geq 78^\circ\text{C}$.

Con el fin de generar las secuencias de los cebadores, primero se seleccionó en el programa la opción que corresponde al kit utilizado para realizar la mutagénesis sitio dirigida (QuickChange® II), después se ingresó la secuencia que codifica para los 322 aminoácidos de la BaEstB, y por último se seleccionaron por separado los residuos Y81 y L211 para cambiarlos por serina y triptófano respectivamente, a continuación el programa genera en automático las secuencias más apropiadas con una temperatura de fusión óptima (Figura 13 y 14).

Primer Name	Primer Sequence (5' to 3')
c637t_t638g_	5'-cgtagtatcccgccacacgaacggcggga-3' 5'-tcccgccttcgtgtggccggatactacg-3'

Oligonucleotide information:

Primer Name	Length (nt.)	T _m	Duplex Energy at 68 °C	Energy Cost of Mismatches
c637t_t638g_	30	78.30°C	-49.43 kcal/mole	8.52%
c637t_t638g_	30	78.30°C	-49.73 kcal/mole	5.64%

Primer-template duplexes:

Primer Name	Primer-Template Duplex
c637t_t638g_	<pre> ctatcccgccggttcgtgtgctgcccgggatactaacggca 3'-agggcggcgaagcacacacggccctatgatgc-5' 5'-tcccgccttcgtgtggccgggatactacg-3' gatagggcggcgaagcacgacggccctatgatgcccgt </pre>

Figura 13. Características y secuencias de primers para mutagénesis de L211W en pPICZαA::BaEstB.

La selección de los residuos que se sustituirían fue a través del análisis de acoplamiento molecular (Docking) con sustratos esterificados y se determinó que el cambio de los aminoácidos Y81 y L211 eran los adecuados para realizar las

Los parámetros para el programa de PCR-All around descritos en el manual QuickChange Lighting Site-Directed Mutagenesis se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Programa de ciclos utilizados para la amplificación de los plásmidos con las mutaciones deseadas.

1 ciclo	95 °C	2 minutos
18 ciclos	95 °C	20 segundos
	60 °C	10 segundos
	68 °C	2.15 minutos
1 ciclo	68 °C	5 minutos

Para la ronda de amplificación se calcularon los 2.15 minutos, tomando en cuenta las 4.5 kb del plásmido y los 30 segundos por cada kb que la enzima necesita.

7.2 Clonación y secuenciación de los plásmidos

pPICZ α A::BaEstB_Y81S y pPICZ α A::BaEstB_L211W

Antes de iniciar la transformación de *E. coli* cepa 1116 con los dos plásmidos se realizó la digestión con una enzima de restricción (Dnpi) que corta en la secuencia GA^m|TC de ADN metilado y hemimetilado, que en este caso es el plásmido pPICZ α A::BaEstB parental purificado a partir de células de *E. coli*. A cada tubo de reacción de PCR se le agregó 2 μ L de enzima DpnI y se incubó por 5.5 minutos a 42 °C en un Termobloque.

7.2.1 Transformación en *E. coli* 1116

De las células transformadas se seleccionaron 4 colonias recombinantes con el plásmido pPICZ α A::BaEstB_L211W y 3 colonias de pPICZ α A::BaEstB_Y81S. Estas se sembraron en placa de agar y en medio líquido LB bajo en sales, ambos con Zeocina® a 25 μ g/mL.

7.2.2 Secuenciación de los plásmidos pPICZαA::BaEstB con las mutaciones en Y81S y L211W

Primeramente, se purificaron los plásmidos pPICZαA::BaEstB_Y81S (colonia 1 y 3) y pPICZαA::BaEstB_L211W (colonia 3) con el Zymo PURE plasmid Miniprep Kit a partir de colecta a las células de 3 mL de medio LB bajo en sales con Zeocina a 25 µg/mL. El DNA plasmídico puro se eluyó en 25 µL, de los que se tomaron 2 µL para su cuantificación en un espectrofotómetro de placa y también se verificó cualitativamente a través de una electroforesis en gel de agarosa.

Se realizó una segunda purificación de los plásmidos de las líneas mutantes (L211W_2 y L211W_4, que corresponden a las colonias 2 y 4 respectivamente), se cuantificó la concentración y se verificó la integridad de los plásmidos (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración de las colonias con plásmidos mutantes purificados para su secuenciación.

	Colonia 1 pPICZαA::Ba EstB_Y81S	Colonia 2 pPICZαA::Ba EstB_Y81S	Colonia 3 pPICZαA::Ba EstB_L211W	Colonia 2 pPICZαA::Ba EstB_L211W	Colonia 4 pPICZαA::BaEs tB_L211W
Concentración (ng/µL)	820.7	400.7	336.6	462.256	586.9
260/280	2.09	2.04	2.052	2.030	2.039

Finalmente, los plásmidos se enviaron a secuenciar en la Unidad de Secuenciación IBT-UNAM. De acuerdo con el análisis de alineamiento de la secuencia de la BaEstB silvestre respecto a las posible mutantes, se confirmaron que las colonias 1 y 3 de Y81S y las colonias 2 y 4 de L211W, contienen los cambios de nucleótidos adecuados para generar las mutaciones en los aminoácidos predichos (Figura 15).

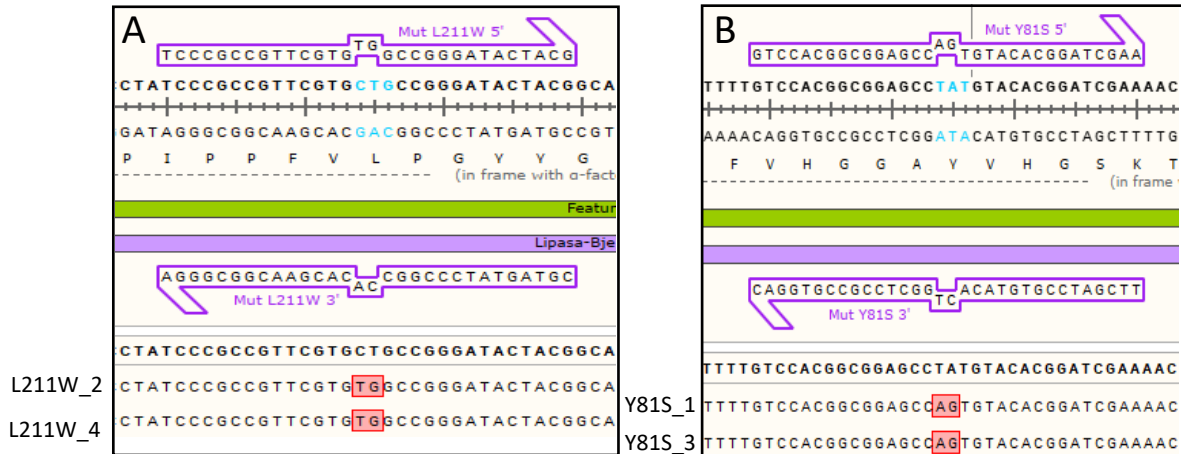


Figura 15. Alineamiento de secuencias. (A) colonias 2 y 4 de las mutantes L211W. (B) colonias 1 y 3 de las mutantes Y81S. El cambio de bases se visualiza en rojo.

7.3 Transformación de pPICZαA::BaEstB_Y81S y pPICZαA::BaEstB_L211W en *Pichia pastoris* X-33

Una vez que se confirmó que las construcciones portan los cambios predichos, se purificaron ambos plásmidos a partir de inóculos de las líneas pPICZαA::BaEstB_L211W_2 y pPICZαA::BaEstB_Y81S_1. Para la transformación de *P. pastoris* se requiere de al menos 20 µg de cada plásmido. El análisis cualitativo de los plásmidos mostró que estaban contaminados con ARN.

Para obtener plásmidos libres de ARN, se realizó una serie de 3 tratamientos con RNasa A, para después precipitarlos, los resultados se muestran en la Tabla 12. La relación 260/280 adecuada y los plásmidos se observan íntegros con la concentración adecuada (Figura 16).

Tabla 12. Concentraciones de los plásmidos purificados y tratados con RNasa A.

	pPICZαA::BaEstB_Y81S_1	pPICZαA::BaEstB_L211W_2
Concentración total (µg)	32	32.2
260/280	1.96	2

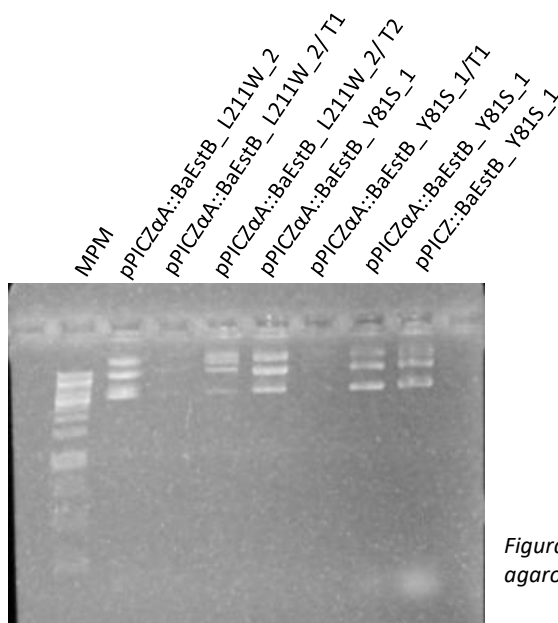


Figura 16. Análisis de integridad de los plásmidos en gel de agarosa al 1%. MPM: 1 kb fermentas.

Se continuó el experimento de acuerdo con el protocolo EasySelect™ *Pichia* Expression Kit de Invitrogen™, con algunas modificaciones. De acuerdo con el protocolo se debe linearizar 20 µg de cada plásmido (pPICZαA::BaEstB_L211W_2 y pPICZαA::BaEstB_Y81S_1) con la enzima SacI (10U) para. estas reacciones se incubaron a 37°C durante 1 hora y media. Las reacciones se detuvieron incubándolas a 65 °C por 20 minutos. Las cantidades de los reactivos se muestran en la Tabla 13. Transcurrido el tiempo, se tomó un alícuota de 2 µL de cada reacción para observar los resultados en gel (Figura 17).

Tabla 13. Cantidades en microlitros de cada reactivo para la reacción de linearización de los plásmidos.

Buffer SacI (10x)	5 µL (5x)	Buffer SacI (10x)	5 µL (5x)
pPICZαA::BaEstB_Y81S_1	11.2 µL (20 µg)	pPICZαA::BaEstB_L211W_2	10.4 µL (20 µg)
Agua	32.8 µL	Agua	33.6 µL
SacI (10U/mL)	1 µL (10U)	SacI (10U/mL)	1 µL (10U)
Total	50 µL		50µL

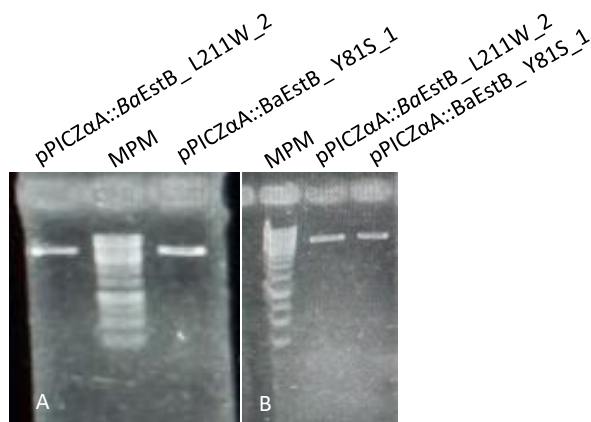


Figura 17. (A) Análisis de integridad de los plásmidos después de 1 hora y media de reacción para su linearización. (B) segunda reacción de linearización después de 1 hora de incubación.

La purificación de los plásmidos linearizados se llevó a cabo por el método de fenol:cloroformo y precipitación con alcohol. Estos se resuspendieron en un volumen de 10 μL de agua y se cuantificaron (Tabla 14), obteniendo concentraciones de 5.04 μg para la mutante L211W y 16.69 μg para la mutante Y81S. De acuerdo con el protocolo EasySelect™ *Pichia* Expression Kit se requiere al menos 5 μg para la electroporación, ya que se estima que se obtienen 10^3 a 10^4 transformantes por μg de ADN linearizado.

Tabla 14. Concentraciones totales y relación 260/280 de los plásmidos linearizado purificados

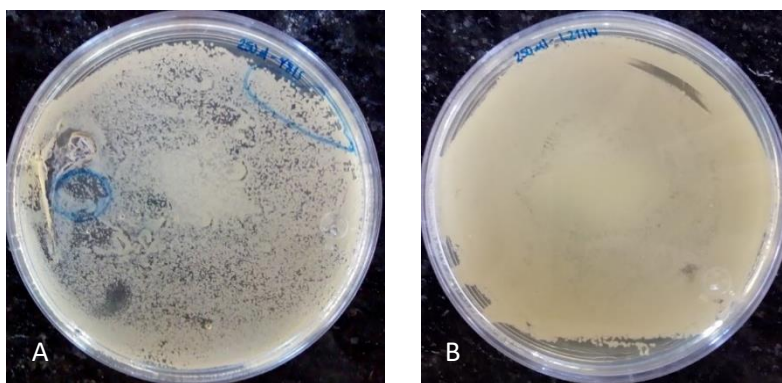
Plásmido	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Vol (μL)	260/280	μg Totales electroporados
L211W linearizado 1	2.89	9	2.06	5.04
L211W linearizado 2	2.15	4	2	
Y81S linearizado 1	6.73	6	2.09	16.69
Y81S linearizado 2	9.96	4	2	

La transformación de las construcciones se llevó a cabo en células de la cepa X-33 de *Pichia pastoris* como se indica en la sección de metodología. Para alcanzar una D.O. de 1.3, la cual se obtuvo después de 6 mediciones tal como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Valores de absorbancia a 600 nm del cultivo de células de *P. pastoris* X-33.

Medición	Abs
1	0.297
2	0.469
3	0.677
4	0.840
5	1.201
6	1.324

Una vez finalizada la electroporación la descarga del equipo arrojó una tensión real de 1950 V para ambas construcciones y 5.9 ms para la cubeta con la construcción pPICZ α A::BaEstB_L211W y 5.8 ms para pPICZ α A::BaEstB_Y81S. Por último, después del periodo de recuperación, se plaquearon distintos volúmenes de un total de 1 mL en medio YPD con 100 μ g/mL de Zeocina® y se incubaron a 30 °C durante 37 horas aproximadamente. En la figura 18 se observa que las células crecieron y saturaron la placa que se sembró con 250 μ L. Sin embargo, se lograron aislar colonias como se indica posteriormente.



*Figura 18. Cultivo de células *P. pastoris* transformadas en medio YPD con 100 μ g/mL de zeocina. (A) 250 μ L pPICZ α A::BaEstB_Y81S. (B) 250 μ L pPICZ α A::BaEstB_L211W*

7.4 Selección de mutantes positivos

7.4.1 Determinación del fenotipo Mut

Con la finalidad de seleccionar las colonias Mut+ (fenotipo de rápido crecimiento), se tomaron 30 colonias de cada construcción, sembrándolas inicialmente en medio mínimo con dextrosa (MD) y después en medio mínimo con metanol (MM), el inductor para la expresión de AOX. Se sembraron 15 colonias por caja Petri y se

incubaron a 30°C durante aproximadamente 3 días. En la Figura 19 se observa que algunas colonias crecidas en MM tienen un crecimiento similar a cuando crecen en MD, en contraste a algunas que crecen lentamente respecto a la misma clona en MD. A partir de las colonias crecidas en MM se seleccionaron 15 colonias de cada construcción incluyendo las remarcadas en cuadros verdes. Estas se resembraron en placas de MD y, posteriormente en agar YPD (100 µg/mL de Zeocina®) por 24 horas y se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior.

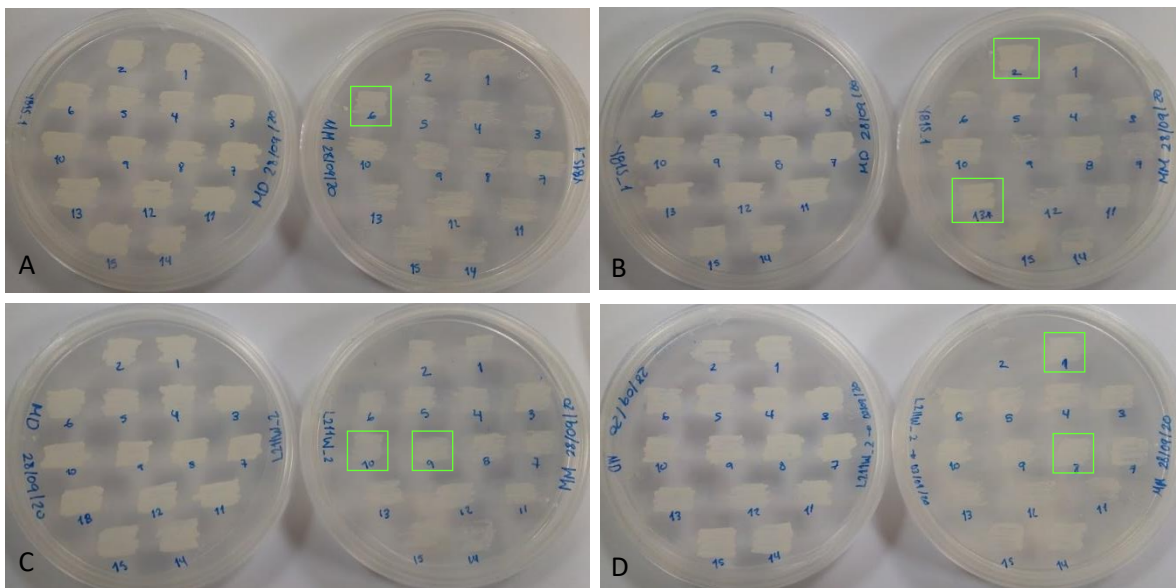


Figura 19. Cultivo en medio mínimo con dextrosa (MD y medio mínimo con metanol (MM) de cada transformante. (A) resiembra de 15 colonias en MD y MM respectivamente. (B) resiembra de otras 15 colonias. Ambas corresponden a las transformantes con pPICZαA::BaEstB_Y81S. (C) y (D) resiembra de 15 colonias diferentes en MD y MM correspondientes a las transformantes con pPICZαA::BaEstB_L211W. Los cuadros verdes señalan el mayor crecimiento observado a simple vista.

7.4.2 Confirmación por PCR de mutantes

Para asegurar que las colonias que se analizarían por PCR de colonia estuvieran induciendo la expresión de las variantes de la BaEstB, se realizó un análisis previo de actividad de 5 colonias de por construcción Y81S y L211W. Las colonias se resuspendieron en 5 mL de medio BMGY y se incubaron a 28°C hasta alcanzar una D.O de 2 a 6. Se recuperó la pastilla de células y se resuspendieron en medio BMMY para iniciar la inducción con metanol al 0.5% de concentración final.

Se realizó una prueba de actividad de los sobrenadantes inducidos. La actividad se detecta por colorimetría, donde el 2-naftil acetato, con un color amarillo, al ser hidrolizado y liberar 2-naftol se torna en rojo. Como control positivo se utilizó una colonia expresando a la *BaEstB* wt y como negativo a las células de *Pichia* X-33 (silvestre) y transformadas con pPICZαA (vector vacío). De las 5 colonias probadas para cada mutante resultaron positivas para la actividad esterasa (Figura 20), con excepción de la Y81S_3.

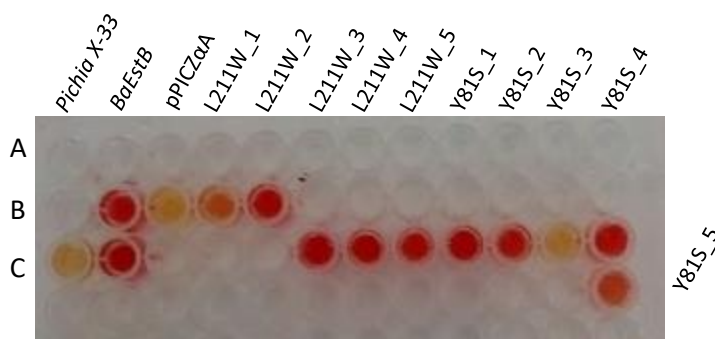


Figura 20. Ensayo de actividad esterasa con el 2-naftil acetato. Los colores rojo y naranja indican actividad esterasa positiva después de 5 minutos de incubación.

Una vez que se confirmó que las colonias seleccionadas tenían actividad, se extrajo ADN genómico para hacer la PCR. Se obtuvo ADN de las 12 muestras seleccionadas, se cuantificó (Tabla 16) y comprobó su integridad (Figura 21).

Tabla 16. Concentración ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$) y relación 260/280 de ADN genómico.

Muestra	ng/ μL	260/280
<i>BaEstB</i>	1490	2.3
pPICZαA	1335	2.3
L211W_1	2735	2.1
L211W_2	2003	2.2
L211W_3	1577	2.3
L211W_4	1402	2.2
L211W_5	1471	2.3
Y81S_1	1239	2.3
Y81S_2	1702	2.3
Y81S_3	1041	2.3
Y81S_4	2994	2
Y81S_5	17.39	30.5

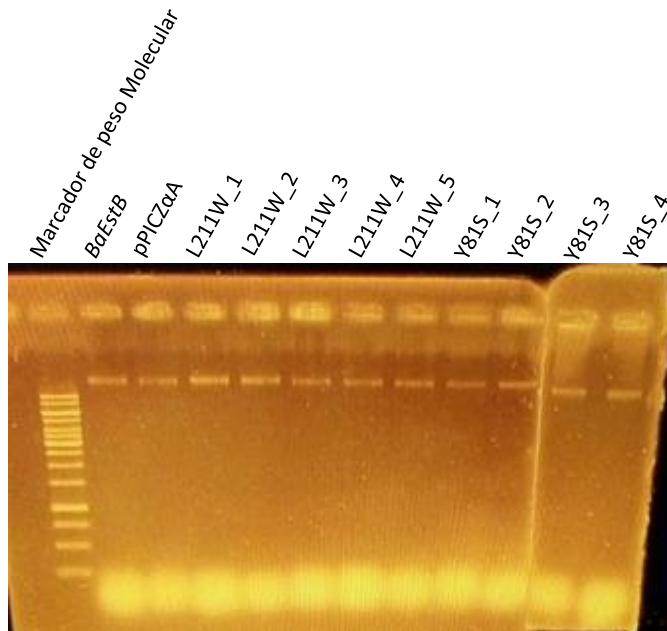


Figura 21. Análisis de integridad de las muestras de ADN genómico en gel de agarosa al 1 %. MPM: 1 kb fermentas.

Dado que en las lecturas de 260/280 se obtuvieron valores superiores a 2 y en gel se observa la contaminación por RNA, se realizó una segunda purificación para eliminar el ARN. Las concentraciones y relaciones 260/280 que se muestran en la Tabla 17 confirman una pureza aceptable para utilizar el ADN en la reacción de PCR.

Tabla 17. Concentraciones de las muestras de ADN después de someterse a tratamiento de purificación con RNasa.

Muestra	ng/ μ L	260/280
BaEstB	351	1.98
pPICZ α A	603	2
L211W_1	108	1.9
L211W_2	235	1.9
L211W_3	163	2
L211W_4	196	1.9
L211W_5	327	2
Y81S_1	710	2
Y81S_2	565	1.9
Y81S_3	236	2
Y81S_4	263	2

En la Figura 22 se observa la presencia de bandas amplificadas de 1500 pb en todas las muestras a excepción de Y81S_1 y L211W_1. Estas corresponden al tamaño del amplicón obtenido usando el par de oligos AOX1. Por otra parte, hubo muestras que presentaron una banda inespecífica de 2000 pb de tamaño. Esto podría indicar que se insertó en el genoma de *P. Pastoris*, el fragmento con la *BaEstB* en el locus AOX pero también que se está amplificando el locus del gen AOX2 el cual se expresa en menor medida que el AOX 1.

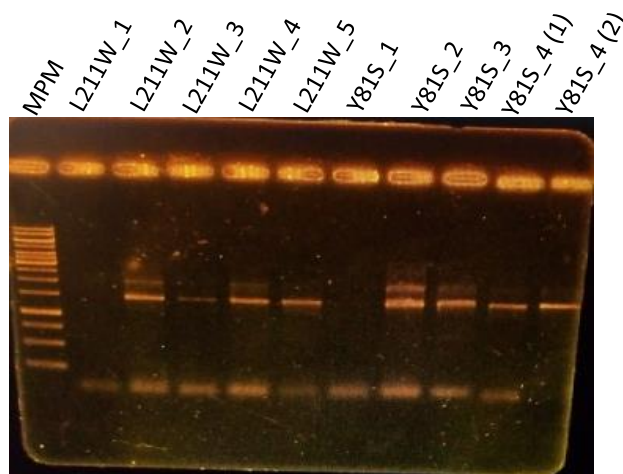


Figura 22. Productos PCR en gel de agarosa al 1%. MPM: 1 kb fermentas.

7.4.3 Secuenciación de productos PCR

Una vez obtenido el amplicón esperado se seleccionó la amplificación de una clona para Y81S y otra para L211W. Estos se purificaron de acuerdo con el protocolo del kit de purificación GeneJET PCR Thermo Scientific. La integridad de las muestras se muestra en la Figura 23, así como la concentración (Tabla 18).

Tabla 18. Concentraciones y relación 260/280 de los productos de PCR purificados.

Muestra	ng/ μ L	260/280
L211W_2	22	2
L211W_4	32	2
L211W_5	32	1.9
Y81S_2	41	1.9
Y81S_3	35	2
Y81S_4	51	1.9

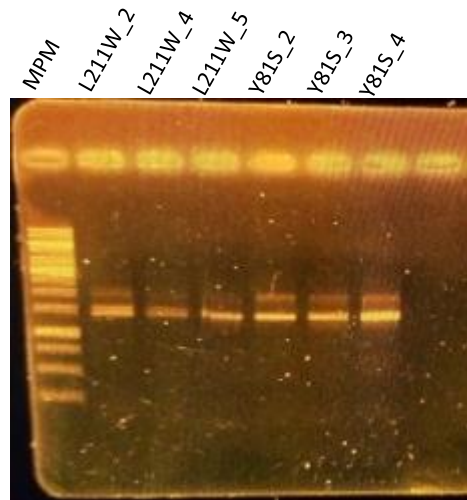


Figura 23. Análisis de integridad de los productos de PCR purificados en gel de agarosa al 1%. MPM: 1 kb fermentas.

Posteriormente se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas de los amplicones para verificar la presencia de las mutaciones puntuales, sin embargo, éstas no contenían las mutaciones deseadas sino el plásmido parental.

Se realizó una segunda transformación a partir de los plásmidos purificados de las clonas *E. coli* 1116 originales que contenían los cambios para generar a las mutantes. Los plásmidos fueron linearizados y transformados en *Pichia pastoris*. A partir de las colonias obtenidas transformadas con las construcciones pPICZαA::BaEstB_Y81S y pPICZαA::BaEstB_L211W se seleccionaron 2 para cada construcción, se realizó nuevamente un PCR a partir de ADN genómico (Figura 24). Estos amplicones se purificaron y se enviaron a secuenciar.

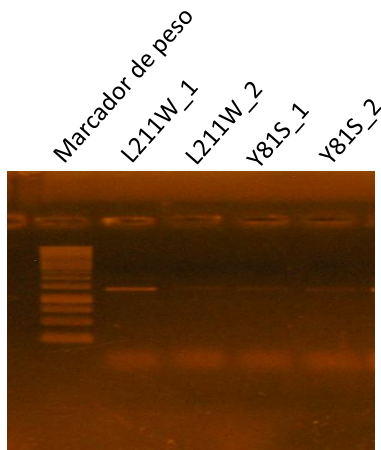


Figura 24. Análisis de integridad de los productos de PCR en gel de agarosa al 1%. Las bandas observadas corresponden a el fragmento esperado de 1500 pb. MPM: 1 kb fermentas

Como se muestra en la Figura 25, el alineamiento de las secuencias confirma las mutaciones deseadas, teniendo el cambio del codón silvestre TAT que codifica para la tirosina por el codón AGT para la serina (Y81S), mientras que para L211W tenemos el cambio de CTG por TGG.



Figura 25. Alineamiento de secuencias de mutantes *BaEstB* A) L211 y B) Y81S respecto a la secuencia *BaEstB* silvestre que se observa a pie de figura con las bases originales encerradas y remarcadas en rojo, mientras que las bases de cada mutante aparecen con su nombre remarcadas en azul.

7.5 Inducción, expresión y purificación *BaEstB* silvestre

Mientras se confirmaban las colonias mutantes se llevó a cabo la inducción y expresión de la *BaEstB* silvestre por duplicado. Se realizó un análisis de expresión a partir de las muestras de cada 24 horas hasta las 72 horas. Los sobrenadantes de cada día fueron concentrados para observarlos en gel de poliacrilamida al 10 % junto con la proteína purificada (elución 1) antes de retirar el imidazol (Figura 26).

Durante la purificación se obtuvieron dos eluciones a partir de la columna, una de 5 y otra de 20 mL. Después se realizó un gel de poliacrilamida al 10 % para determinar la presencia de proteína en las fracciones de lavado y las dos eluciones (Figura 27).

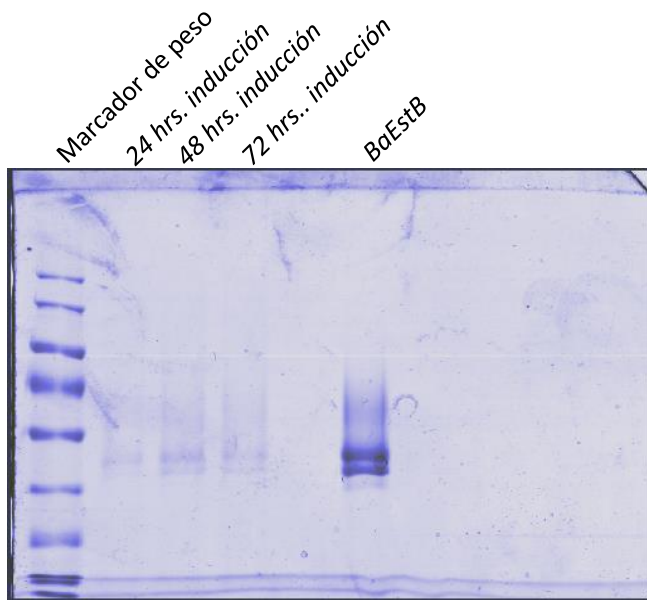


Figura 26. Análisis de inducción de la proteína BaEstB silvestre en gel SDS-PAGE teñido con azul de coomasie.

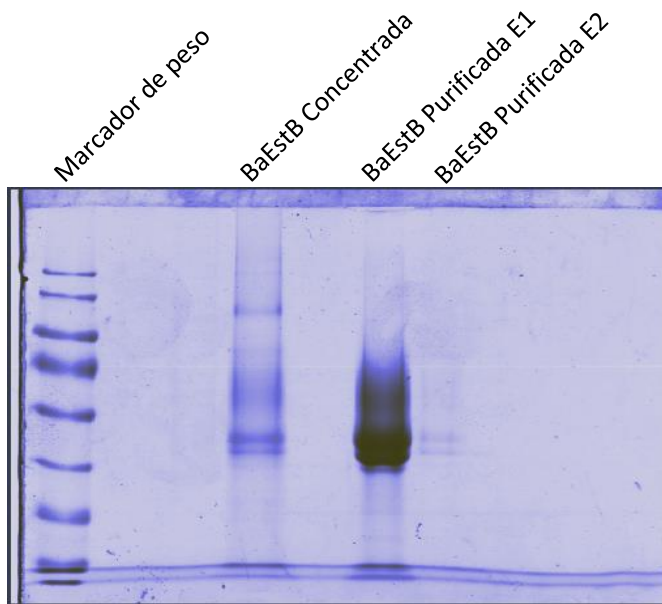


Figura 27. Análisis de purificación de la proteína BaEstB en SDS-PAGE teñido con azul de coomasie. Muestras del sobrenadante concentrado, elución 1 y 2 a partir de la columna de níquel.

Se realizaron 5 alícuotas de la BaEstB purificada con 20% de glicerol a partir de la elución 1 y se cuantificaron junto con una alícuota de la elución 2, y del sobrenadante a las 72 hrs (Tabla 19).

Tabla 19. Concentración de la *BaEstB* purificada por columna de Niquel y del sobrenadante, determinada por Bradford.

BaEstB pura	Concentración (ug/ul)
Tubo 1 E1	1.7375
Tubo 2 E1	1.7455
Tubo 3 E1	1.7965
Tubo 4 E1	1.7765
Tubo 5 E1	1.708
Tubo 1 E2	0.186
Sobrenadante 72 h	0.1308

7.5.1 Análisis de inducción *BaEstB* mutantes por colony blot

Se realizó el análisis de inducción de las mutantes de la *BaEstB* mediante un inmunoensayo, se observó la producción de proteína. Se tomó como control negativo la mutante pPICZ α A vacío, y como positivo *BaEstB* silvestre. Estos controles y las dos cepas mutantes se sembraron en un patrón cuadrangular en placas de agar de medio BMM. Para la inducción de la proteína en la placa se añadió metanol al 0.5% en la tapa, por lo que se mantuvieron todo el tiempo invertidas, cada 24 horas hasta por 72 horas. Se tomaron muestras cada 24 horas, en réplicas de cajas. Y después se realizó un dot blot usando un anticuerpo anti-myc para detectar a la proteína. Una vez realizado el revelado, las colonias que generan señal son las que secretaron proteína heteróloga, en este caso las dos mutantes (Y81S y L211W), las cuales produjeron la proteína entre las 24 y 48 horas (Figura 28). El máximo de producción se alcanza a las 48 horas, dada la mayor coloración que presentan el control positivo y ambas mutantes (Figura 28a).

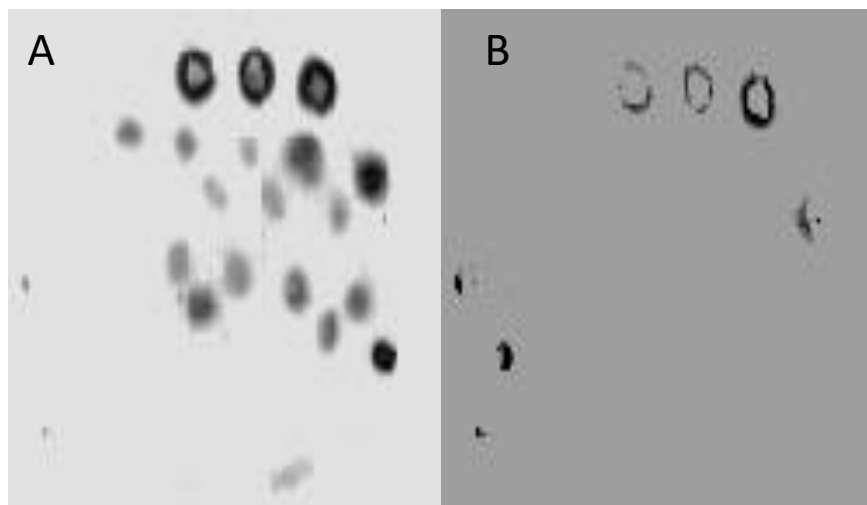


Figura 28. Dot blot colony. A) controles y mutantes ya cumplidas las 48 horas. B) controles y mutantes dentro de las primeras 24 horas. En ambas figuras el orden es de izquierda a derecha: pPICZ α A Vacío, BaEstB, L211W y Y81S.

7.6 Ensayos de actividad esterasa y determinación de los parámetros cinéticos de *BaEstB* wt

Para los experimentos de actividad se utilizaron 50 ng de *BaEstB* wt pura y concentrada (1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). En primera instancia se calcularon las actividades volumétricas y específicas a una sola concentración de sustrato. Todas las lecturas a intervalos de minuto durante los 30 minutos se promediaron para obtener el porcentaje de rendimiento de la purificación el cual fue de 10.83 (Tabla 20).

Tabla 20. Rendimiento en la expresión y purificación de la enzima *BaEstB* en el sistema de expresión heteróloga *Pichia pastoris*.

	Actividad volumétrica (U/mL)	Volumen (mL)	Actividad Específica (U/mg)	Proteína total (mg/mL)	Fracción pura	Recuperación (%)
Sobrenadante 72 H	2.8	90	21.43	11.772	1	100
<i>BaEstB</i> pura	54.11	0.75	31.13	1.275	1.45	10.83

Se realizó un análisis comparativo de la actividad de la *BaEstB* respecto a una lipasa (CalB) y feruloil-esterasa (Depol) (Donadas por el grupo del Dr. Edmundo Castillo IBt-UNAM). Como primer paso, se realizó el ensayo de actividad a diferentes concentraciones de sustrato. De igual manera se promediaron los valores obtenidos

de actividad específica de acuerdo con cada concentración obteniendo los resultados de la Tabla 21.

Tabla 21. Actividad enzimática de la *BaEstB*, *CalB* y *Depol* usando 2-naftil acetato.

[<i>BaEstB</i>]	[S]	Actividad Específica (U/mg)
50 ng	0.1 mM	25.46
50 ng	0.2 mM	29.38
50 ng	0.4 mM	40.14
50 ng	0.8 mM	32.19
50 ng	1 mM	35.33
[<i>CalB</i>]	[S]	Actividad Específica (U/mg)
50 ng	0.1 mM	0.118
50 ng	0.2 mM	0.176
50 ng	0.4 mM	0.202
50 ng	0.8 mM	0.224
50 ng	1 mM	0.207
[<i>Depol</i>]	[S]	Actividad Específica (U/mg)
50 ng	0.1 mM	0.091
50 ng	0.2 mM	0.027
50 ng	0.4 mM	0.024
50 ng	0.8 mM	0.038
50 ng	1 mM	0.089

Se eligió el 2-naftil acetato (2-NA) como modelo dada la buena actividad previamente reportada con esta enzima y por los datos obtenidos *in silico*. primero, para determinar los parámetros cinéticos experimentales se determinaron las actividades para cada concentración del 2-NA. Las mediciones se llevaron hasta un tiempo de 30 minutos, para asegurarnos que trabajábamos con concentraciones de enzima y sustrato que se mantienen en velocidad inicial (recta lineal). Una vez comprobado esto con cada concentración, se repitieron las cinéticas de cada concentración para tomar las que mantenían un mínimo error en las determinaciones, todo esto durante 5 minutos. Obteniendo así las velocidades iniciales de 50 ng de enzima *BaEstB* a diferente concentración de 2-NA, como se observa en la gráfica (Figura 29) y Tabla 22 mostradas a continuación. Por parte del *p*-NPA fue difícil lograr un modelo cinético MM, probablemente por la auto hidrólisis que se presenta, o bien, por la baja preferencia que tiene la *BaEstB*.

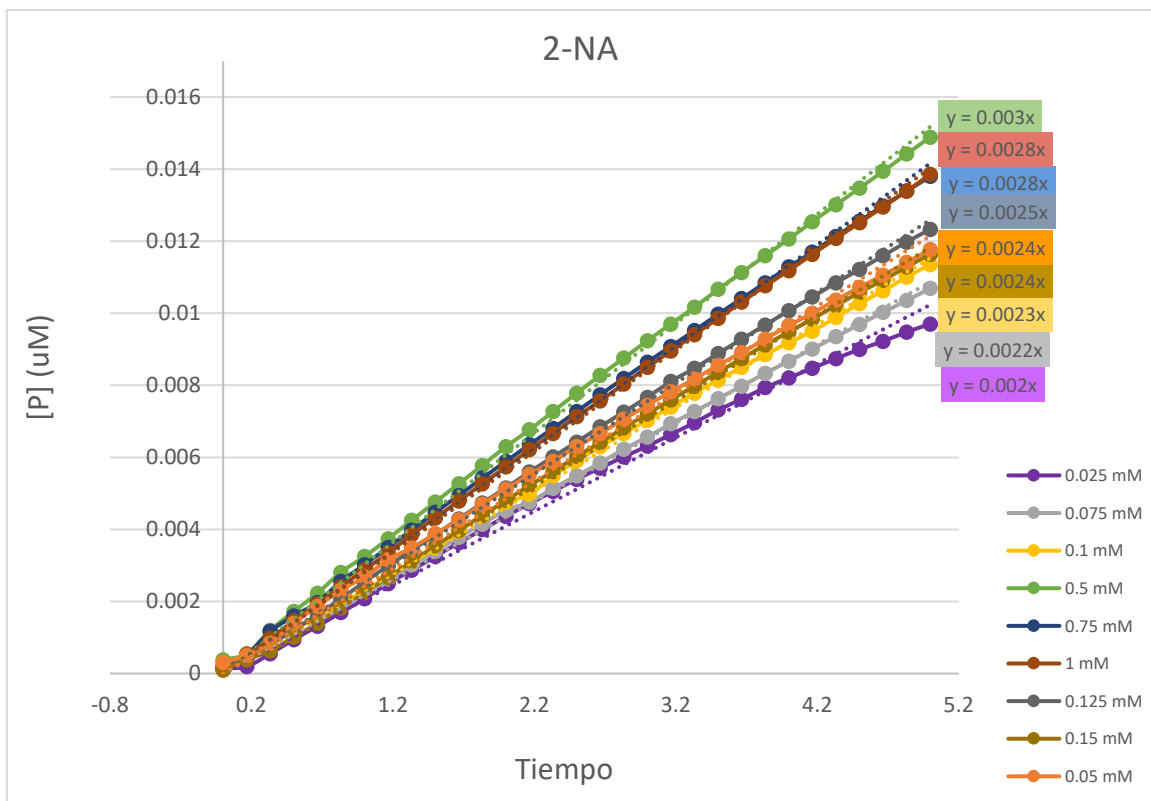


Figura 29. Gráfica de velocidades iniciales a 9 diferentes concentraciones del sustrato 2-NA con 50 ng de enzima pura. Las pendientes (m) resultantes de cada experimento corresponden a las velocidades iniciales de la reacción, mismas que se utilizaron posteriormente para la representación Michealiana.

Tabla 22. Velocidades iniciales a diferente concentración de sustrato 2-NA en unidades de micromol y milimol con 50 ng de enzima pura total.

50 ng [E]			
[2-NA]			
umol	mM	V0	V0 (umol/min)
0.01	0.00001	0	0.0E+00
25	0.025	0.002	6.0E-07
50	0.05	0.0024	6.6E-07
75	0.075	0.0022	6.6E-07
100	0.1	0.0023	6.9E-07
125	0.125	0.0025	7.5E-07
150	0.15	0.0024	7.2E-07
500	0.5	0.003	9.0E-07
750	0.75	0.0028	8.4E-07
1000	1	0.0028	8.4E-07
D.E.			8.22222E-08

Para generar una gráfica hiperbólica (modelo Michaeliano), fue necesario transpolar la velocidad a cero que no era posible realizar experimentalmente. Esto se realizó

con la ecuación de la gráfica. Tomando en cuenta la dispersión en los valores para obtener la V_o de cada punto. La gráfica obtenida se ajusta a una gráfica Michaeliana, como se muestra a continuación (Figura 30).

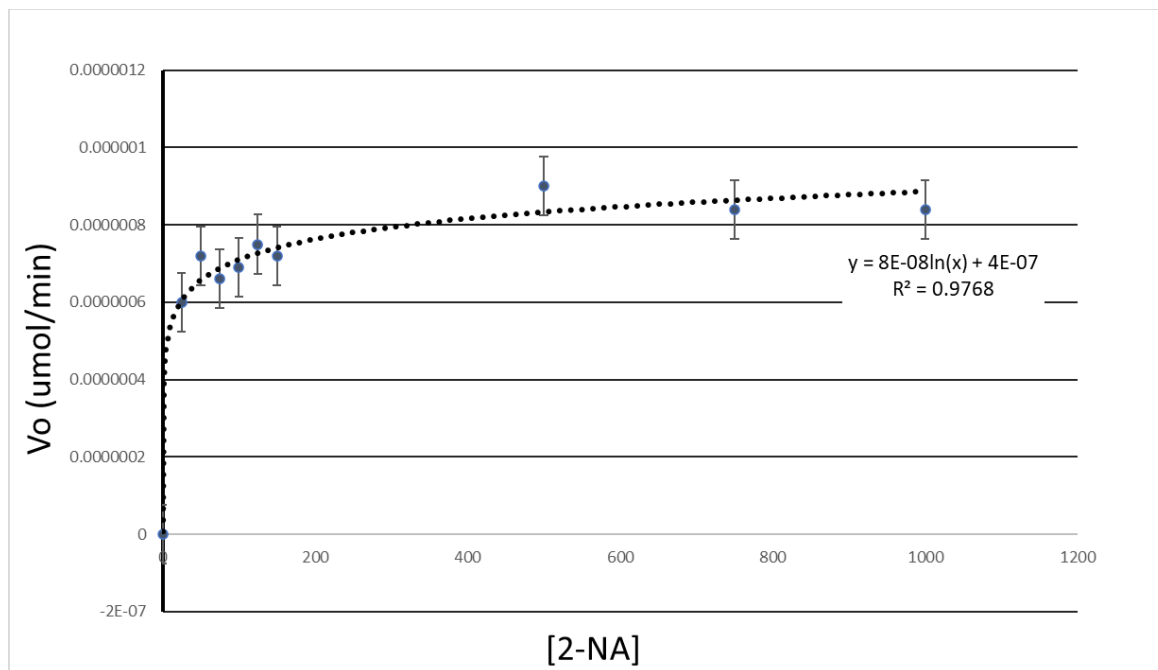


Figura 30. Representación clásica del modelo enzimático Michaelis-Menten. Observamos que tomando en cuenta la desviación estándar promedio, los datos experimentales se ajustan a dicho modelo tomando en cuenta también el valor de R^2 .

Los parámetros cinéticos (K_M , V_{\max} , K_{cat} y K_M/K_{cat}) se determinaron mediante ajuste de regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten. Se probaron 3 modelos, en donde el que más se ajusta a una recta lineal con un índice de correlación de 0.99 fue el modelo Hanes-woolf, (Figura 31). A partir de la ecuación de la recta $[S]/V = 1/V_{\max}[S] + K_M/V_{\max}$, se obtuvo el valor de V_{\max} que es igual 1×10^{-6} ($\mu\text{mol}/\text{min}$), y para K_m que es igual a $b^* V_{\max}$ da igual a $20 \mu\text{M}$, el valor de K_{cat} se obtuvo dividiendo $V_{\max}/[E]$ total, lo cual corresponde a $1.23 \times 10^{-02} \text{ s}^{-1}$. Por último, el valor de la eficiencia catalítica para la *BaEstB* wt frente al 2-NA a temperatura ambiente ($\sim 28^\circ\text{C}$) a pH 7, fue de $6.13 \times 10^{-04} \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Estos valores se obtuvieron mediante la tabulación de los inversos para generar el gráfico (Tabla 23) y así se obtuvo la ecuación del gráfico que se muestra a continuación.

Tabla 23. Inversos de $[S]/V$ y $[S]$ para cada concentración de sustrato (2-NA). Estos datos tabulados son los que se grafican para obtener la representación lineal de la cinética a 50 ng de enzima.

μmol	$V_0 (\mu\text{mol}/\text{min})$	$[S]/v$	$[S]$
0.01	0.000001	10000	0.01
25	0.0000006	4.2E+07	25
50	0.00000066	7.6E+07	50
75	0.00000066	1.1E+08	75
100	0.00000069	1.4E+08	100
125	0.00000075	1.7E+08	125
150	0.00000072	2.1E+08	150
500	0.0000009	5.6E+08	500
750	0.00000084	8.9E+08	750
1000	0.00000084	1.2E+09	1000

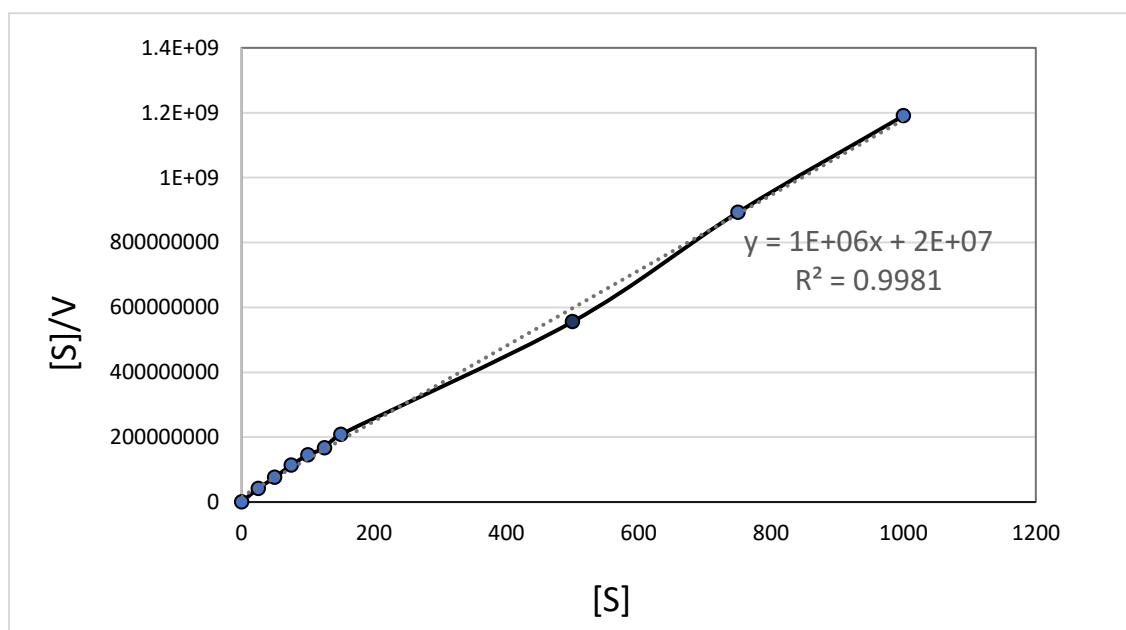


Figura 31. Representación lineal del modelo Hanes-Woolf. Se grafica en el eje de las y el inverso $[S]/v$ y en el eje de las x $[S]$.

8. DISCUSIÓN

Sánchez-Carbente y col. en 2017 reportaron que la *BaEstB* muestra una diferencia de casi 18 veces en la actividad específica entre el 2-NA y *p*-NPA, además de una diferencia de 32 veces con el *p*-NPB. Esto sugería que la *BaEstB* tiene preferencia marcada por sustratos con cadenas alifáticas de 2C y dos anillos aromáticos por el lado alcohol. Esto abría la posibilidad de que la enzima prefiriera más de dos anillos aromáticos.

Mediante un análisis de docking Hernández-Fuentes (2019), reportó que la *BaEstB* tiene mayor energía de afinidad por el ergosteroil acetato como sustrato. Lo que se confirmó con la disminución del 60.5% con 200 ng de enzima pura, mediante el cálculo de la disminución del área bajo la curva respecto al blanco por HPLC. Esto reafirma la preferencia de la *BaEstB* por ésteres con cadenas alifáticas de 2C, y demuestra que también influye el resto alcohol del sustrato, que en el caso del ergosterol son 4 anillos uno de ellos aromático.

Por otra parte, se reportó la actividad de 45.08 U/mg para el 2-naftil acetato y para el 1-naftil acetato 1.96, U/mg, evaluado por ensayos de colorimetría. Esto indica que la *BaEstB* presenta regioselectividad. Este tipo de comportamiento, también se reportó en la HSL esterasa que se aisló a partir de una librería metagenómica (Est25), mostró una preferencia en términos de actividad relativa por 2-NA>1-NA>1-NB (Ngo *et al.*, 2013). Al igual que una arilesterasa (Est0881) que comparte una alta identidad de secuencia con las HSL, la preferencia para el 2-NA es mayor respecto al 1-NA y *p*-NPA, con valores de K_M de 5.2, 7.9 y 17.4 μ M, respectivamente (Navarro-Gonzalez *et al.*, 2012).

Dentro de la familia IV de enzimas lipolíticas bacterianas (HSL) la actividad de regioselectividad varía dependiendo del sustrato, existen algunas que contrario a la *BaEstB* presentan preferencia por el 1-NA (Ca-Est, Est2528 y Esterasa A) que solo se ve superada en las primeras dos por el *p*-NPA y en la última por *p*-NPB (Nagaroor & Gummadi, 2020; Navarro-González, 2012; Soror *et al.*, 2009). Encontramos estas y otras esterases que exhiben una preferencia por ésteres de *p*-nitrofenilos que de

naftilo, como lo son EstB28, EstATII-TM y Est19, (Sumbly *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2021) o bien actividad nula (E69) donde el largo de cadena va entre 2 y 6 C (Huo *et al.*, 2017).

Se eligió el 2-naftil acetato por la notable preferencia de la HSL esterasa *BaEstB* para determinar los parámetros cinéticos. Hemos determinado que la K_M es de 20 μM , mientras que para la Est2528 la afinidad es 30 veces menor (604 μM), y por otra parte una Est0881 perteneciente a las A-esterasas (arilesterasas), encontramos un valor de K_M 5.2 μM casi 4 veces menor que *BaEstB*, siendo la arilesterasa la que muestra una preferencia por los mismos sustratos en el mismo orden (2-NA>1-NA>*p*-NPA>*p*-NPB). Sin embargo, en términos de eficiencia catalítica hay 5 órdenes de magnitud, siendo la Est0881 más activa y eficiente para el 2-NA.

De todas las estererasas citadas, ninguna ha sido caracterizada con sustratos no convencionales, lo que por una parte limita la información acerca de la preferencia y además no proporciona conocimiento sobre posibles sustratos naturales, los cuales podrían presentar mayor actividad y eficiencia, teniendo así una caracterización bioquímica más completa que nos brinde nuevas perspectivas para poder probar las estererasas HSL con la gran variedad de sustratos esterificados que existen. Además de poder relacionar su actividad y función fisiológica, su evolución y metabolismo del organismo de donde fueron aisladas.

Existe una gran variedad de afinidad de sustratos tipo éster que puede haber entre estererasas de la familia HSL (Kim, 2017). Las investigaciones recientes han propuesto que la especificidad puede estar dada por la disposición de las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman el túnel de entrada al sitio catalítico de estas enzimas. Diversos trabajos demuestran que, al generar mutantes con cambios en los aminoácidos dentro del túnel cambia la afinidad, sin embargo, es importante evaluarlas en términos de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M) (Le *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2021).

En el caso de *BaEstB* wt el túnel tiene forma corta y recta, por lo que el sustrato (*p*-NPA) queda cerca de la superficie. En las dos mutantes propuestas anteriormente

(Y81S y L211W), se observa que en la mutante Y81S el túnel se alarga y permite que el sustrato se introduzca mucho más, mientras que la conformación espacial del túnel de la mutante L211W cambia a una especie de hendidura en la que el sustrato se empaqueta a lo largo de esta. Se espera que con el 2-NA, *p*-NP esteres de más de 2C y ergosteroil acetato la K_M se mantenga o incluso mejore para las mutantes respecto a la *BaEstB* wt, puesto que se observó que conforme aumenta el número de carbonos en la cadena acilo de los *p*-NP las energías de afinidad de unión y el número de poses cercanas al sitio activo mejoran. Sin embargo, es posible que sea todo lo contrario y no haya realmente una mejora en términos de eficiencia catalítica (Hernández-Fuentes, 2019).

9. CONCLUSIONES

Se generaron las construcciones con los cambios pPICZ α A::*BaEstB*_L211W y pPICZ α A::*BaEstB*_Y81S para las líneas mutantes de la HSL *BaEstB*, las cuáles fueron verificadas por secuenciación.

Se transformaron las construcciones para generar las líneas mutantes en *P. pastoris* y se seleccionaron 15 colonias con el fenotipo Mut+ a partir de las clonas transformadas con cada una de las construcciones (pPICZ α A::*BaEstB*_L211W y pPICZ α A::*BaEstB*_Y81S) mencionadas anteriormente.

Paralelamente a la confirmación de las mutantes se expresó y purificó una cantidad suficiente de *BaEstB* silvestre con un rendimiento en el sistema de expresión heteróloga *Pichia pastoris* de un 10.83%.

Gracias a la obtención de la enzima silvestre purificada se obtuvieron resultados de actividad de hidrólisis del 2-naftil acetato comparada con una lipasa (CalB) y una feruloil esterasa (Depol), en donde se podría decir que la lipasa sobrepasa ligeramente en preferencia al sustrato que la lipasa, mientras que la *BaEstB* mantiene actividad similar a las repostadas anteriormente frente al mismo sustrato. Respecto a la obtención de los parámetros cinéticos, solamente con el 2-NA se logró obtener un modelo gráfico de comportamiento Micheliano. Derivado del ajuste lineal según el modelo de Hanes-woolf y al utilizar la ecuación del gráfico se calcularon

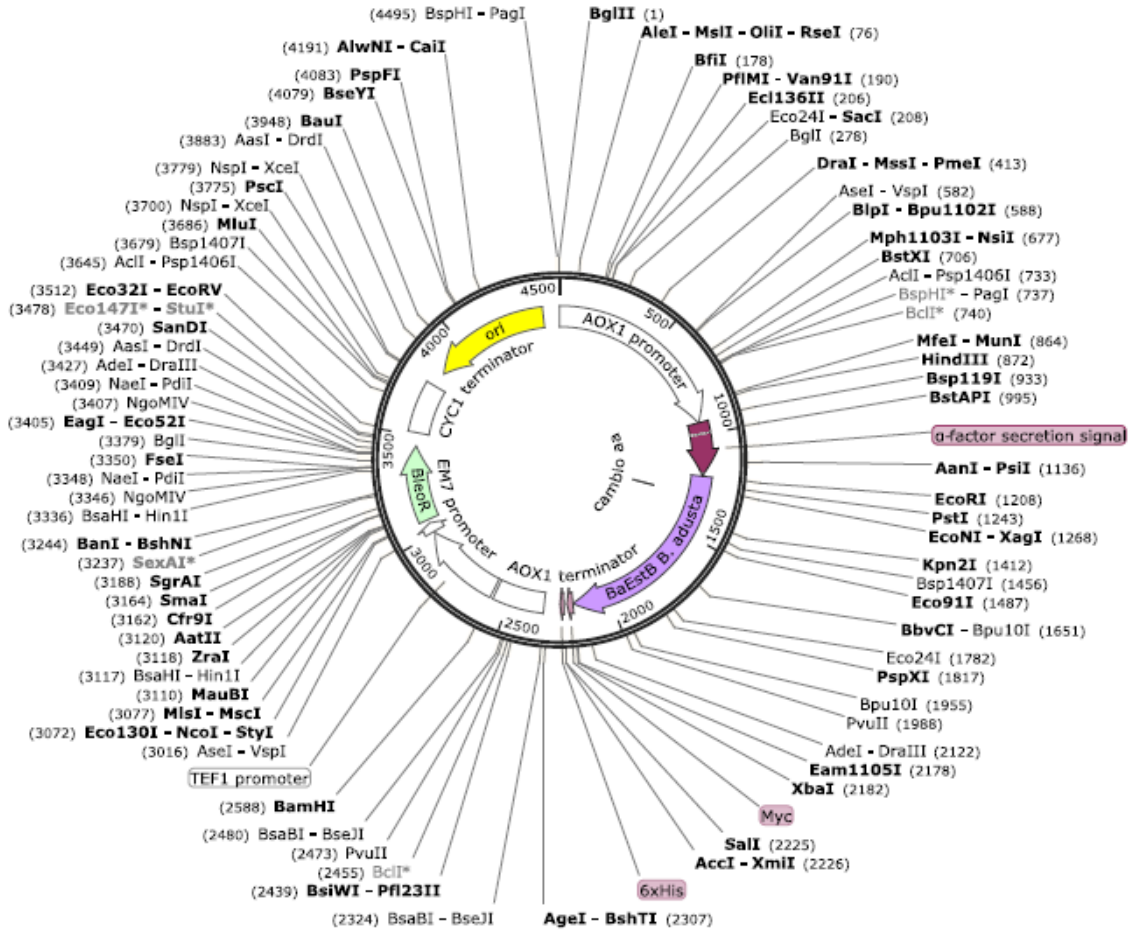
los parámetros cinéticos K_M , V_{max} , K_{cat} y K_M/K_{cat} los cuales fueron $20 \mu\text{M}$, $1 \times 10^{-6} \mu\text{mol}/\text{min}$, $1.23 \times 10^{-02} \text{ s}^{-1}$ y $6.13 \times 10^{-04} \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente a pH 7 a temperatura ambiente ($\sim 28^\circ\text{C}$).

10. PERSPECTIVAS

Para dilucidar la afinidad de la *BaEstB* sobre el ergosteroil acetato y el 2-NA, se recomienda establecer las cinéticas a diferentes $[S]$ y $[E]$ en condiciones óptimas, esto es a pH 7 y a una temperatura de 45°C . Con los datos obtenidos, se obtendrían resultados comparativos de actividad y de afinidad, además de buscar una correlación entre la estructura de estos sustratos y los residuos de aminoácidos que se encuentran en el túnel de entrada al sitio activo. Así se podría resolver si el ergosterol es un sustrato natural en *Bjerkandera adusta*, y por otra parte se podría caracterizar su actividad frente a sustratos no convencionales, como algunos esteroides esterificados y alcoholes terciarios. Por último, se requiere purificar a las proteínas mutantes (L211W y Y81S) para comparar sus actividades y afinidades con las observadas para la *BaEstB* silvestre, y determinar si las mutantes generadas tienen cambios en los parámetros cinéticos observados para la silvestre.

11. ANEXOS

Anexo 1. Mapa de la construcción pPICZαA::BaEstB.



Anexo 2. Protocolo de la estandarización para obtener los parámetros cinéticos

Para la obtención de los parámetros cinéticos se estableció el protocolo para la medición del producto de hidrólisis del 2-naftil acetato mediante su detección por espectrofotometría.

Primero fue necesario establecer las concentraciones adecuadas de enzima a una concentración de 0.1 mM de 2-NA. Se realizaron las cinéticas a [E] de 12.5, 15, 20, 25 y 50 ng, para graficar tiempo vs la aparición de producto (2-naftol) y así elegir la concentración de enzima que mantenía un comportamiento totalmente lineal desde el origen. Una vez que se eligió trabajar los 50 ng de enzima, se realizaron los demás ensayos cinéticos a diferentes concentraciones de sustrato desde 0.025 mM hasta 1 mM, ya que fue la concentración máxima de solubilidad del sustrato en el medio acuoso.

Para reducir el error en las lecturas es necesario tomar en cuenta lo siguiente al preparar las soluciones para la mezcla de reacción.

1. Realizar alícuotas del stock del sustrato disuelto en acetona, además de mantenerlas en refrigeración en todo momento para evitar una evaporación y por ende una pérdida de volumen que afecte a la concentración final de sustrato.
2. Utilizar agua grado MiliQ para los buffers, filtrarlos, hacer alícuotas y mantenerlos en refrigeración después de su uso.
3. El buffer PBS al 1X con tritón al 0.1% debe de realizarse al momento de utilizarlo, cubrir con aluminio y no almacenarlo más de un día. Aplicar lo mismo para la solución 2 y desechar cuando se observe que la sal de sulfato se encuentra precipitada, esto puede variar de 2 a 3 horas.
4. La mezcla de sustrato debe de realizarse siguiendo la relación v/v y a una concentración adecuada de sustrato para que la concentración final de cada pozo de la placa (300 μ L) sea la adecuada.
5. Realizar la suficiente mezcla de sustrato para las repeticiones necesarias con la enzima incluyendo el blanco de cada concentración de sustrato.

6. Se deben de preparar todos los reactivos y dejar al último la dilución de la enzima. Una vez hecha desecharla cuando haya cumplido aproximadamente 1 hora, ya que deja de ser estable.
7. Para preparar la mezcla de reacción y proceder a la lectura, el orden es muy importante, por lo que primero se agrega la enzima diluida, después el buffer Tris-HCl 10 mM y al último la mezcla de sustrato. Este último no debe de agregarse demasiado rápido para evitar la formación de burbujas, pero que tampoco sobrepase los 5 segundos e incluir un breve pipeteo. Una vez hecho esto, comenzar inmediatamente con la lectura.

NOTA: al programar el equipo lector es necesario solamente seleccionar los pocillos que contienen la mezcla de reacción, para que sea posible obtener las lecturas cada 10 segundos. Además, todos los ensayos de cinética de cada concentración de sustrato deben de realizarse por separado.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
2. Ahmed, S. F., Abdallah, R. Z., & Siam, R. (2022). Evaluation of a Thermophilic, Psychrostable, and Heavy Metal-Resistant Red Sea Brine Pool Esterase. *Marine Drugs*, 20(5), 274.
3. Ali, Y. B., Verger, R., & Abousalham, A. (2012). Lipases or esterases: Does it really matter? Toward a new bio-physico-chemical classification. *Methods in Molecular Biology (Clifton NJ)*, 861, 31–51.
4. Anobom, C. D., Pinheiro, A. S., De-Andrade, R. A., Aguiéiras, E. C., Andrade, G. C., Moura, M. V., ... & Freire, D. M. (2014). From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International*, 2014.
5. Arpigny, J. L., & Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochemical Journal*, 343(Pt 1), 177–183.
6. Arroyo, M.; Acebal, C.; de la Mata, I. (2014). "Biocatálisis y biotecnología". *Arbor*, 190 (768): a156.
7. Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*, 26(1), 73-81.
8. Bornscheuer, U. T., & Kazlauskas, R. J. (2006). *Hydrolases in organic synthesis: regio-and stereoselective biotransformations*. John Wiley & Sons.
9. Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International journal of molecular sciences*, 16(9), 20774-20840.
10. Cereghino, G. P. L., & Cregg, J. M. (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current opinion in biotechnology*, 10(5), 422-427.

11. Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., & Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 329-332.
12. Chirumamilla, R. R., Muralidhar, R., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Molecular and cellular biochemistry*, 224(1-2), 159-168.
13. Choi, J. M., Han, S. S., & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances*, 33(7), 1443-1454.
14. Choi, Y. J., & Lee, B. (2001). Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(1), 59-63.
15. Chu, X., He, H., Guo, C., & Sun, B. (2008). Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(4), 615-625.
16. Demain, A. L., & Adrio, J. L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular biotechnology*, 38(1), 41.
17. Demir, N., Acar, J., Sarıoğlu, K., & Mutlu, M. (2001). The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. *Journal of Food Engineering*, 47(4), 275-280.
18. Esteban-Torres, M., Santamaría, L., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2014). Characterisation of a cold-active and salt-tolerant esterase from *Lactobacillus plantarum* with potential application during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 39(2), 312-315.
19. Farahat, S. M., Rabie, A. M., & Farag, A. A. (1990). Evaluation of the proteolytic and lipolytic activity of different *Penicillium roqueforti* strains. *Food chemistry*, 36(3), 169-180.
20. Gerard D. 2015. Lipinov. Romainville, FR: Adebitech.
21. Gerhartz, W. (1990). *Enzymes in industry: production and applications*. VCH-Verlagsgesellschaft.

22. Giuliani, S., Piana, C., Setti, L., Hochkoeppler, A., Pifferi, P. G., Williamson, G., & Faulds, C. B. (2001). Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. *Biotechnology Letters*, 23(4), 325-330.
23. Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. *OCL*, 24(4), D403. doi:10.1051/ocl/2017031
24. Gutiérrez-Fernández, J., Vaquero, M. E., Prieto, A., Barriuso, J., Martínez, M. J., & Hermoso, J. A. (2014). Crystal structures of *Ophiostoma piceae* sterol esterase: structural insights into activation mechanism and product release. *Journal of structural biology*, 187(3), 215-222.
25. Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 89(1), 17-34.
26. Hernández- Fuentes, D. (2019). Estudio *in silico* de la interacción de la esterasa HSL *BaEstB* de *Bjerkandera adusta* con sustratos esterificados y evaluación de su actividad in vitro (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México.
27. Hess, M. (2008). Thermoacidophilic proteins for biofuel production. *Trends in microbiology*, 16(9), 414-419.
28. Higgins, D. R. (2007). *Pichia* protocols (Vol. 268). J. M. Cregg (Ed.). Totowa: Humana Press.
29. Holmquist, M. (2000). Alpha beta-hydrolase fold enzymes structures, functions and mechanisms. *Current Protein and Peptide Science*, 1(2), 209-235.
30. Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 118(1-3), 155-170.
31. Huo, Y. Y., Rong, Z., Jian, S. L., Xu, C. D., Li, J., & Xu, X. W. (2017). A novel halotolerant thermoalkaliphilic esterase from marine bacterium *Erythrobacter seohaensis* SW-135. *Frontiers in microbiology*, 8, 2315.
32. Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of cellular physiology*, 235(9), 5867-5881.

33. Karpushova, A., Brümmer, F., Barth, S., Lange, S., & Schmid, R. D. (2005). Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 59–69.
34. Kim, T. D. (2017). Bacterial hormone-sensitive lipases (bHSLs): Emerging enzymes for biotechnological applications. *J Microbiol Biotechnol*, 27, 1907-1915.
35. Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 345-351.
36. Kovacic, F., Babic, N., Krauss, U., & Jaeger, K. (2019). Classification of lipolytic enzymes from bacteria. *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, 24, 255-289.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
37. Lenfant, N., Hotelier, T., Velluet, E., Bourne, Y., Marchot, P., & Chatonnet, A. (2012). ESTHER, the database of the α/β -hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic acids research*, 41(D1), D423-D429.
38. Le, L. T. H. L., Yoo, W., Lee, C., Wang, Y., Jeon, S., Kim, K. K., ... & Kim, T. D. (2019). Molecular characterization of a novel cold-active hormone-sensitive lipase (Ha HSL) from *Halocynthiaibacter arcticus*. *Biomolecules*, 9(11), 704.
39. Li, P. Y., Ji, P., Li, C. Y., Zhang, Y., Wang, G. L., Zhang, X. Y., ... & Zhang, Y. Z. (2014). Structural basis for dimerization and catalysis of a novel esterase from the GTSAG motif subfamily of the bacterial hormone-sensitive lipase family. *Journal of Biological Chemistry*, 289(27), 19031-19041.
40. Li, Z. Y., & Ward, O. P. (1993). Lipase-catalyzed esterification of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate in organic solvent. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(8), 745-748.
41. Liu, Q., Xun, G., & Feng, Y. (2019). The state-of-the-art strategies of protein engineering for enzyme stabilization. *Biotechnology advances*, 37(4), 530-537.

42. Liu, Y., Xu, H., Yan, Q., Yang, S., Duan, X., & Jiang, Z. (2013). Biochemical characterization of a first fungal esterase from *Rhizomucor miehei* showing high efficiency of ester synthesis. *PloS one*, 8(10), e77856.
43. Liu, X., Zhou, M., Xing, S., Wu, T., He, H., Bielicki, J. K., & Chen, J. (2021). Identification and biochemical characterization of a novel hormone-sensitive lipase family esterase Est19 from the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. E2-15. *Biomolecules*, 11(11), 1552.
44. Long, Z. D., Xu, J. H., Zhao, L. L., Pan, J., Yang, S., & Hua, L. (2007). Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 47(3-4), 105-110.
45. López-Iglesias, M., & Gotor-Fernández, V. (2015). Recent Advances in Biocatalytic Promiscuity: Hydrolase-Catalyzed Reactions for Nonconventional Transformations. *The Chemical Record*, 15(4), 743-759.
46. Luo, X. J., Yu, H. L., & Xu, J. H. (2012). Genomic data mining: An efficient way to find new and better enzymes. *Enzyme Eng*, 1, 104-108.
47. Mohamad Tahir, H., Raja Abd Rahman, R. N. Z., Chor Leow, A. T., & Mohamad Ali, M. S. (2020). Expression, characterisation and homology modelling of a novel hormone-sensitive lipase (HSL)-like esterase from *Glaciozyma antarctica*. *Catalysts*, 10(1), 58.
48. Mustranta, A. (1992). Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. *Applied microbiology and biotechnology*, 38(1), 61-66.
49. Nagaroor, V., & Gummadi, S. N. (2020). Biochemical characterization of an esterase from *Clostridium acetobutylicum* with novel GYSMG pentapeptide motif at the catalytic domain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(2), 169-181.
50. Navarro-González, I. (2012). Clonación, expresión, caracterización y modelado de esterasas putativas de *Corynebacterium glutamicum* ATTC 13032. In *Anales de Biología* (No. 34, pp. 77-89). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia.

51. Navarro-Gonzalez, I., Sanchez-Ferrer, A., & Garcia-Carmona, F. (2012). Molecular characterization of a novel arylesterase from the wine-associated acetic acid bacterium *Gluconobacter oxidans* 621H. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(43), 10789-10795.
52. Ngo, T. D., Ryu, B. H., Ju, H., Jang, E., Park, K., Kim, K. K., & Kim, T. D. (2013). Structural and functional analyses of a bacterial homologue of hormone-sensitive lipase from a metagenomic library. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(9), 1726-1737.
53. Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., ... & Sussman, J. L. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 197-211.
54. Quax, W. J., & Broekhuizen, C. P. (1994). Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs. *Applied microbiology and biotechnology*, 41(4), 425-431.
55. Rajamanickam, V., Metzger, K., Schmid, C., & Spadiut, O. (2017). A novel bi-directional promoter system allows tunable recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1-7.
56. Ramnath, L., Sithole, B., & Govinden, R. (2017). Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. *Canadian journal of microbiology*, 63(3), 179-192.
57. Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Synthetic oligonucleotides.
58. Sánchez-Carbente, M. D. R., Batista-García, R. A., Sánchez-Reyes, A., Escudero-Garcia, A., Morales-Herrera, C., Cuervo-Soto, L. I., & Folch-Mallol, J. L. (2017). The first description of a hormone-sensitive lipase from a basidiomycete: Structural insights and biochemical characterization revealed *Bjerkandera adusta* BaEstB as a novel esterase. *MicrobiologyOpen*, 6(4), e00463.
59. Singhanian, R. R., Patel, A. K., & Pandey, A. (2010). *Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success*; Soetaert W, Vandamme EJ, Eds.

60. Song, Y. R., & Baik, S. H. (2017). Molecular cloning, purification, and characterization of a novel thermostable cinnamoyl esterase from *Lactobacillus helveticus* KCCM 11223. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(5), 496-504.
61. Soror, S. H., Rao, R., & Cullum, J. (2009). Mining the genome sequence for novel enzyme activity: characterisation of an unusual member of the hormone-sensitive lipase family of esterases from the genome of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Protein Engineering, Design & Selection*, 22(6), 333-339.
62. Sumbly, K. M., Jiranek, V., & Grbin, P. R. (2013). Ester synthesis and hydrolysis in an aqueous environment, and strain specific changes during malolactic fermentation in wine with *Oenococcus oeni*. *Food chemistry*, 141(3), 1673-1680.
63. Stergiou, P. Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L. G., ... & Papamichael, E. M. (2013). Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology advances*, 31(8), 1846-1859.
64. Stergiou, P. Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L. G., ... & Papamichael, E. M. (2013). Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology advances*, 31(8), 1846-1859.
65. Stevenson, D. E., Stanley, R. A., & Fumeaux, R. H. (1993). Glycerolysis of tallow with immobilised lipase. *Biotechnology letters*, 15(10), 1043-1048.
66. Stewart, G. G. (2015). Yeast quality assessment, management and culture maintenance. In *Brewing Microbiology* (pp. 11-29). Woodhead Publishing.
67. Sugihara, A., Shimada, Y., Nomura, A., Terai, T., Imayasu, M., Nagai, Y., ... & Tominaga, Y. (2002). Purification and characterization of a novel cholesterol esterase from *Pseudomonas aeruginosa*, with its application to cleaning lipid-stained contact lenses. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(11), 2347-2355.

68. Verger, R. (1997). 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, 15(1), 32-38.
69. Welte, M. A. (2009). Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets. *Biochemical Society Transactions*, 37(5), 991-996.
70. Wu, S., & Letchworth, G. J. (2004). High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*, 36(1), 152-154.
71. Yan, Q. J., Yang, S. Q., Duan, X. J., Xu, H. B., Liu, Y., & Jiang, Z. Q. (2014). Characterization of a novel hormone-sensitive lipase family esterase from *Rhizomucor miehei* with tertiary alcohol hydrolysis activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 109, 76-84.
72. Yang, S., Qin, Z., Duan, X., Yan, Q., & Jiang, Z. (2015). Structural insights into the substrate specificity of two esterases from the thermophilic *Rhizomucor miehei*. *Journal of lipid research*, 56(8), 1616-1624.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 13 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (CEIB UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Ramón Alberto Batista García (CIDC UAEM)

Dr. Edmundo Castillo Rosales (IBT UNAM)

Tesis: **Evaluación de la preferencia de la HSL BaEstB sobre el 2-naftil acetato vs p-nitrofenil acetato mediante parámetros cinéticos**

Alumno que lo presenta a revisión: **María Guadalupe Morales Morales**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2022-06-20 09:39:25 | Firmante

RS0BoQq3Q+xNEHO8Akcv5qBbXv7gULvheP6LZwHhqdrcGAgQ+6F947mNEu2cBC68vb3sXu21gQKmEZ8/veUOluaBzDLrywrDgfJdfPq0IFMQsSC1bvRzmgJzN1d/ADs2rAb3O+ZJZ2sqmEZkr+ZB3u9ABc7RQXopQpaAqEzjIUl0njiC6V3oNQ1Z4Q2PNeKxQdlv0UdVCcunXT9mHrXj4JYU7wyFD7Yj7+yJ0jVDG+AajRQv1jMMc3aFgfsVYEHXNjmaekNFIVhL6AXHuDB6jdtbvCXo7mFZ15wFS89aE/f39BfQizuk9DugfbMleWWat6tDo37OgeZ32LJRMf2A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[ZzhAk06DS](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/e8KFKKmPsYHq6Q0WArh4kvlvEkGPd4Wq>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 13 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (CEIB UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Ramón Alberto Batista García (CIDC UAEM)

Dr. Edmundo Castillo Rosales (IBT UNAM)

Tesis: **Evaluación de la preferencia de la HSL BaEstB sobre el 2-naftil acetato vs p-nitrofenil acetato mediante parámetros cinéticos**

Alumno que lo presenta a revisión: **María Guadalupe Morales Morales**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2022-06-22 17:20:57 | Firmante

KdrV5jUosdv7TLETbq2wulTFbZVjGILHGmDN5IA4Nb3KU7rkZPLq467ATC/KrpFdacGt41z/3gxnYcVoZE+O7WfNjjaqJR5UcjUEfehFk+HV0fpF0gQkLgMH7o2Vr2zka6wqZKdc66f
ujy9NmjITx3lB6K/lcHa32D1OBfFmIJW1Uiyj4zWcDPHds9O0F7A1nV/0MiXzd/ZKNp8tx/nsmCEU6+BqFn9y3r6JbjPkUBuB9/URna//O24SAkGDkdqWrrJ+sZzxrqbe0vMgaulchad6
5w7qEc7U0dxEqAh8G+gn9Jtx3niBnWrEpCAOCvKyzks9cyjSE0x0XQx76yxANA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[sNpeV2gWG](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/PanfEQYRt61YZQ5dd3tstmxmWZobppY>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 13 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (CEIB UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Ramón Alberto Batista García (CIDC UAEM)

Dr. Edmundo Castillo Rosales (IBT UNAM)

Tesis: **Evaluación de la preferencia de la HSL BaEstB sobre el 2-naftil acetato vs p-nitrofenil acetato mediante parámetros cinéticos**

Alumno que lo presenta a revisión: **María Guadalupe Morales Morales**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2022-06-24 10:44:38 | Firmante

woZQtvm/133CfG5W4qg/Omh2oG+4EaAtMjFIN5z08OWMdpmuNtJmK4c4zCbzWh8c1T6Z2+oyNyKOaFvDA7qEyipkmAoO3ZWXJ6mnFt+4t/d/90MkrhFqngl4LG3ns+QUg6BGMPdyKDax6zysJexyzVUEN057R2pqQnIYn5VvQnOyvp+hubH+1H+O1Jfs71NHLjDwL7Qk/vy6oHAKcreVW8N6DxgHtslNhyy2cUuSHDcF/f2mzfxb8bAfhF2++OIW5RJ9o4AG/T3n6CQTEfkwXitdykDIGF1tEPtzCvCHctW40dM6WtFS15ekKNTXgYaaSA2QiQ8JjieKfQKOA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



FjdLRPmyp

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/BP8czRbXbPmsHZ5wfrp7TS4O6mK7F8Jm>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 13 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (CEIB UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Ramón Alberto Batista García (CIDC UAEM)

Dr. Edmundo Castillo Rosales (IBT UNAM)

Tesis: **Evaluación de la preferencia de la HSL BaEstB sobre el 2-naftil acetato vs p-nitrofenil acetato mediante parámetros cinéticos**

Alumno que lo presenta a revisión: **María Guadalupe Morales Morales**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 13 de junio del 2022.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (director de tesis, CEIB UAEM)

Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte (CEIB UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Ramón Alberto Batista García (CIDC UAEM)

Dr. Edmundo Castillo Rosales (IBT UNAM)

Tesis: **Evaluación de la preferencia de la HSL BaEstB sobre el 2-naftil acetato vs p-nitrofenil acetato mediante parámetros cinéticos**

Alumno que lo presenta a revisión: **María Guadalupe Morales Morales**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. EDMUNDO CASTILLO ROSALES